

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSI KARLA AMADEU

**DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO  
IDEAIS DA SALIVA PARA A AVALIAÇÃO DO ESTADO OXIDATIVO**

CURITIBA

2015

JOSI KARLA AMADEU

DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO  
IDEAIS DA SALIVA PARA A AVALIAÇÃO DO ESTADO OXIDATIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes.

CURITIBA

2015

Amadeu, Josi Karla

Determinação da temperatura e tempo de armazenamento ideais da saliva para a avaliação do estado oxidativo / Josi Karla Amadeu – Curitiba, 2015.  
83 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. José Miguel Amenábar Cespedes

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Estresse oxidativo. 2. Saliva. 3. Preservação de amostras. 4. Estado oxidativo.  
5. Oxidantes. 6. Antioxidantes. I. Amenábar Cespedes, José Miguel. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.6

## TERMO DE APROVAÇÃO

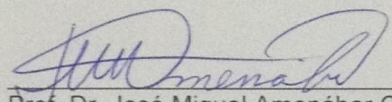
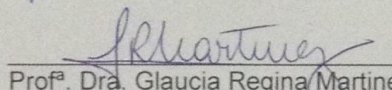
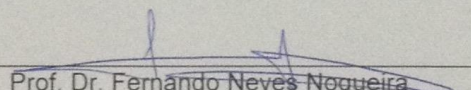
JOSI KARLA AMADEU

## TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO  
IDEAIS DA SALIVA PARA A AVALIAÇÃO DO ESTADO OXIDATIVO

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre no  
Programa de Pós-graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes  
Programa de Pós-graduação em Odontologia, UFPR  
\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Glaucia Regina Martinez  
Departamento de Bioquímica e Biologia Celular, UFPR  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira  
Departamento de Estomatologia, USP

Curitiba, 31 de julho de 2015.

A Deus, por me fortalecer em sua fé, me ensinar a ter perseverança, a superar os desafios com paciência e sabedoria.

Aos meus pais, Carlos e Angela, exemplos de caráter e determinação. E que mesmo distantes estiveram sempre presentes. Jamais poderei retribuir o seu infinito amor e a renúncia de tantos sonhos em favor de minha educação.

A minha irmã, Nicole, a minha maior incentivadora para que continuasse me aperfeiçoando e fosse atrás do meu sonho. Por seu companheirismo, amizade e amor. Você é o meu orgulho.

Ao meu esposo, Norman, por me apoiar ao longo dessa jornada, com amor e compreensão. Obrigada por sempre estar ao meu lado e por sonhar os nossos sonhos. Amo você.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. Cassius Carvalho Torre-Pereira, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná, por todos os anos de trabalho e de dedicação a esta escola. Por sua acolhida e pelos seus ensinamentos na disciplina de estomatologia enquanto cursava as disciplinas de docência.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Miguel Amenábar Céspedes, por aceitar em ser meu mentor durante o mestrado e pelo incentivo na realização desta pesquisa. Obrigada por todos os ensinamentos e pela inspiração ao longo desta jornada.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Juliana Lucena Schussel, pelos ensinamentos, pelo companheirismo, pelo otimismo nas horas mais difíceis e por doar parte de seu tempo durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Cleto Mariosvaldo Piazzetta, pela sua imensa sabedoria e seu imenso amor à profissão, por espelhar novos docentes, eu inclusive, pela sua acolhida e pelos seus ensinamentos na disciplina de estomatologia enquanto cursava as disciplinas de docência.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação, exemplos de profissionalismo e amor à profissão. Obrigada pela rica contribuição em minha formação pessoal e profissional.

Aos meus colegas de turma, pelo carinho e pela amizade sincera neste caminho que percorremos juntos. Tenho certeza que levaremos esses laços por toda a nossa vida. Admiro-os muito e sei que posso contar com vocês sempre, assim como podem contar comigo.

À minha colega Aline Louise Lemes, por estar presente em todos os momentos, pela amizade que construímos, pelo companheirismo no desenvolvimento desta pesquisa, pelos ótimos momentos de convívio.

À Universidade Federal do Paraná, por me presentear com a oportunidade de fazer parte de sua história durante os anos de Graduação e Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio parcial financeiro dessa trajetória.

A todos aqueles que a sua maneira, contribuíam para que este trabalho pudesse ser realizado.

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo”. (Walter S. Landor)

## RESUMO

O estresse oxidativo (EO) é o desequilíbrio a favor das espécies oxidantes em relação aos antioxidantes presentes num meio. Quando este ocorre em sistemas biológicos, pode causar diversos danos que estão relacionados a eventos como envelhecimento, câncer, doença periodontal, dentre outros. A saliva está sendo muito utilizada para avaliar o EO em diferentes condições bucais e sistêmicas, através do estado oxidante total (EOT) e da capacidade antioxidante total (CAT). No entanto, a literatura não traz uma padronização no que diz respeito a tempo e temperatura de armazenamento e a manutenção da CAT, do EOT e da relação entre eles denominada de índice de estresse oxidativo (IEO). O propósito deste estudo foi analisar a preservação da CAT, do EOT e do IEO da saliva em duas temperaturas diferentes de armazenamento ao longo de 120 dias. Foram coletadas 16 amostras de saliva de pacientes saudáveis para realização do estudo. Uma alíquota foi selecionada para análise imediata e as demais armazenadas a -20°C e a -80°C por um período de até 120 dias, sendo que as análises foram realizadas nos dias 15, 30, 45, 60, 90 e 120. A determinação do EOT e da CAT foi realizada através de métodos colorimétricos. Os resultados mostraram que as duas temperaturas de armazenamento foram capazes de manter as concentrações dos oxidantes e dos antioxidantes estáveis até 60 dias. Após esse tempo houve uma queda na concentração em ambas as temperaturas, mostrando que começa a haver uma perda destes componentes na saliva. Quando comparadas as diferentes temperaturas de armazenamento em cada tempo, não foram observadas diferenças significativas. Por fim, foi verificado que o IEO tende a aumentar ao longo do tempo de armazenamento em ambas as temperaturas, mas sem diferenças estatísticas significativas. As duas temperaturas foram capazes de manter tanto o EOT e a CAT estáveis, sendo confiáveis para avaliação do estresse oxidativo na saliva no período de 60 dias.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Saliva. Preservação de amostras. Estado oxidativo. Oxidantes. Antioxidantes.



## **ABSTRACT**

The oxidative stress (OS) is an imbalance between the reactive oxygen species (ROS) and the antioxidants increasing the oxidative status. When this occurs in biological systems, may cause many injuries that are related with events such as aging, cancer, periodontal diseases and others. Saliva is been widely used to evaluate the OS in different oral and systemic conditions, through the total oxidant status (TOS), the total antioxidant capacity (TAC) and the relation between them, called oxidative stress index (OSI). Nevertheless, there is no knowledge regarding temperature and time storage for TAC, TOS and OSI preservation. The aim of this study was to analyze the OS preservation of saliva in different storage over 120 days through the TAC and TOS at two different temperatures. Sixteen saliva samples were collected from healthy patients for the study. An aliquot was selected for immediate analysis and the rest was stored at -20°C and -80°C for a period of 120 days, and analyzes were performed in 15, 30, 45, 60, 90 and 120 days. The determination of the TOS and the TAC were performed by colorimetric methods. The results show that the two storage temperatures were able to preserve stable oxidants and antioxidants up to 60 days. Thereafter there was a drop in concentration evaluated for both temperatures, showing that there are a decrease of these components in saliva. When comparing the different storage temperatures on each time, no significant differences were observed. Finally, when it was calculated the OSI, this tends to increase over time of storage at both temperatures, but without statistically significant differences. The two temperatures were able to keep both the TOS and the TAC stable, and reliable for assessing oxidative stress for 60 days.

**Keywords:** Oxidative stress. Saliva. Storage. Oxidative status. Oxidants. Antioxidants.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs).....	68
FIGURA 2- TOTAL DE AMOSTRAS ANALISADAS.....	68

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	A MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO E DESVIO PADRÃO DOS OXIDANTES, ANTIOXIDANTES E O ÍNDICE DO ESTRESSE OXIDATIVO A TEMPERATURA DE -20°C.....	69
TABELA 2-	A MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO E DESVIO PADRÃO DOS OXIDANTES, ANTIOXIDANTES E O ÍNDICE DO ESTRESSE OXIDATIVO A TEMPERATURA DE -80°C.....	70

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1-	EXEMPLO DE CURVA PADRÃO PARA O EOT (1a) E A CAT 1b).....	71
GRÁFICO 2-	(2a) MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO DOS OXIDANTES NAS DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE 120 DIAS. (2b) MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES NAS DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE 120 DIAS.....	72
GRÁFICO 3-	ÍNDICE DE ESTRESSE OXIDATIVO AO LONGO DOS 120 DIAS.....	73

## LISTA DE SIGLAS

$^1\text{O}_2$	-	Oxigênio singlete
CAT	-	Capacidade antioxidante total
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
EOT	-	Estado oxidante total
ERN	-	Espécies reativas de nitrogênio
ERO(s)	-	Espécie(s) reativa(s) de oxigênio
G6DP	-	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GSH	-	Glutathiona reduzida
GSH-Px	-	Glutathiona peroxidase
GSH-Rd	-	Glutathiona redutase
GSSG	-	Glutathiona oxidada
IEO	-	Índice de estresse oxidativo
MDA	-	Malondialdeído
NADPH	-	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
PBS	-	Tampão fosfato básico
SOD	-	Superóxido dismutase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1	SALIVA.....	14
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO.....	15
1.3	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	18
1.4	AGENTES ANTIOXIDANTES .....	22
1.4.1	Antioxidantes enzimáticos .....	22
1.4.2	Antioxidantes não-enzimáticos .....	24
1.5	PESQUISAS RELACIONADAS COM OXIDANTES, ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO UTILIZANDO SALIVA .....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	33
3.2	COLETA DA SALIVA .....	33
3.3	ARMAZENAMENTO .....	33
3.4	ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	34
3.4.1	Determinação do estado oxidante total (EOT).....	34
3.4.2	Determinação da capacidade antioxidante total (CAT).....	35
3.4.3	Determinação do índice de estresse oxidativo (IEO).....	36
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>4</b>	<b>ARTIGO .....</b>	<b>37</b>

<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 SALIVA

A saliva é um fluido aquoso e transparente (THOMADAKI *ET AL.*, 2011) produzido e secretado por três pares de glândula maiores: parótida, sublingual e submandibular, além de centenas de outras glândulas salivares menores que também contribuem para a sua produção (SPIELMANN E WONG, 2011). Muitas vezes chamado de "espelho do corpo" ou considerada a "janela sobre o estado de saúde", o fluido oral é um meio explorado na área da saúde (SEGAL E WONG, 2008). Está composta por uma grande porção de água, de aproximadamente 98%, e o restante por compostos orgânicos e inorgânicos. Tem a importante função de manter úmidas a mucosa e as superfícies dos dentes, ao mesmo tempo em que é o solvente geral das substâncias do meio bucal (SPIELMANN E WONG, 2011).

A saliva total é considerada um fluido fisiológico que contém, além do produto das glândulas salivares, diversas substâncias em quantidades variáveis, que incluem fluidos originados da orofaringe, fluido crevicular, compostos derivados do plasma sanguíneo, microflora, restos alimentares, células epiteliais descamativas, dentre outros (CHIAPPIN *ET AL.*, 2007; THOMADAKI *ET AL.*, 2011). Ela reflete praticamente todo o espectro de estado normal e de doença de um indivíduo incluindo as substâncias naturais do tecido bucal e uma grande variedade de moléculas introduzidas ao organismo como, por exemplo, alimentos e fármacos. Consequentemente, a concentração destes são alterados com o estado emocional, hormonal, imunológico, neurológico e metabólico do indivíduo. Quase tudo o que pode ser medido no sangue também pode ser medido na saliva. Como exemplo, estão disponíveis



no mercado alguns kit salivares já aprovados pela Administração de comidas e drogas (*Food and Drug Administration- FDA*), instituição regulamentadora dos Estados Unidos, como os para avaliação do HIV, do abuso de drogas, dentre outros (HOFMAN, 2001).

Devido às suas diversas características, a saliva tem sido alvo de pesquisas para avaliação dos estados de saúde e de doença de pacientes (CRYSTAL, 1991; ARANA *ET AL.*, 2006; HEGDE, RAI E PADMANABHAN, 2009; REUTER *ET AL.*, 2010; AL-RAWI, 2011; EMEKLI-ALTURFAN *ET AL.*, 2013). E ainda tem sido utilizada como método para investigação e avaliação do estresse oxidativo salivar (MOORE *ET AL.*, 1994; DIAB-LADKI, PELLAT E CHAHINE, 2003; ARANA *ET AL.*, 2006; CAĞLAYAN *ET AL.*, 2008; FERRARI, 2010; AL-RAWI, 2011; VLKOVÁ *ET AL.*, 2012).

## 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres, principalmente das espécies reativas de oxigênio (EROs), e das defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal de sistemas aeróbicos (SIES, 1991). Apesar das espécies reativas de oxigênio participarem de muitos processos fisiológicos, elas podem ser muito prejudiciais aos tecidos quando a sua produção é descontrolada (BLAKE *ET AL.*, 1990; PARKINSON, 1995), pois algumas são altamente reativas e normalmente geradas durante a respiração celular e o metabolismo.

Em condições fisiológicas, os radicais livres podem funcionar como ativadores de moléculas envolvidas na função celular, como por exemplo, a

transmissão de sinal de várias expressões gênicas (HALLIWELL, 2006). Porém, quando em excesso nos tecidos, contribui para uma condição patológica por danificar as moléculas extra e intracelulares, bem como por ativar excessivamente processos celulares, como a alteração do volume da matriz extracelular, os danos ao DNA, a desnaturação da proteína e/ou a oxidação de lipídios (HALLIWELL, 2006).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e agentes antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes, levando a uma perturbação na sinalização e no controle redox e/ou dano molecular (FINK, 2007). A intensidade e patogenicidade destes desequilíbrios vão depender, naturalmente, das concentrações locais de espécies pró oxidantes e antioxidantes presentes, das constantes de velocidade da reação com moléculas-alvo e da compartimentalização celular destes processos, em que fatores de solubilidade e difusibilidade são determinantes (GOW E ISCHIROPOULOS, 2001).

Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação dos radicais livres, porém a membrana celular é uma das mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, que é a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares acarretando alterações em suas estruturas e na sua permeabilidade (MELLO FILHO, HOFFMANN E MENEHINI, 1984). Consequentemente, há uma perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos e posteriormente a formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA), culminando em morte celular. A peroxidação lipídica também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e da toxicidade

de xenobióticos, que são compostos estranhos ao organismo e podem causar uma série de danos à saúde, uma vez que apresentam ação tóxica sobre as células humanas (SHAN, AW E JONES, 1990; ROSS E MOLDEUS, 1991). Assim como na formação dos radicais livres, nem sempre os processos de peroxidação lipídica são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata do ácido araquidônico na formação de prostaglandinas e, portanto, na resposta inflamatória. O radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora e mais importante da peroxidação lipídica. Entretanto, estudos indicam que o ferro também desempenha papel determinante na iniciação deste processo (MINOTTI E AUST, 1987; HORTON, RICE-EVANS E FULLER, 1989).

Em condições de estresse oxidativo, o desequilíbrio redox pode desencadear inúmeras desordens sistêmicas (FERREIRA E MATSUBARA, 1997; GUTTERIDGE E HALLIWELL, 2000; EREL, 2004). Diversos estudos demonstram a participação dos radicais livres em inúmeros processos patológicos. Por exemplo, brevemente, no câncer, o estresse oxidativo pode ativar os fatores de crescimento, as citocinas inflamatórias, as quimiocinas, as moléculas reguladoras do ciclo celular e as moléculas anti-inflamatórias. Então são ativadas as vias inflamatórias que levam à transformação de uma célula normal em célula tumoral. Essas observações sugerem que o estresse oxidativo, a inflamação crônica e o câncer estão intimamente ligados (REUTER *ET AL.*, 2010).

Sendo assim, se faz necessário controlar a produção excessiva de EROs, assegurar níveis adequados de antioxidantes e quelantes de metais presentes no organismo. A qualidade da dieta (maior consumo de vegetais,

leguminosas e frutos) ou ainda evitar comportamentos conducentes a uma maior produção de radicais livres como o uso de tabaco e a exposição excessiva a poluentes ambientais e xenobióticos são fatores essenciais nesta manutenção (LACHANCE, NAKAT E JEONG, 2001).

É importante notar que os poluentes são mediadores para várias desordens humanas. Neste contexto, a inalação de carcinógenos ambientais, tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na fumaça do cigarro estão associados com o aumento do risco de doenças. A fumaça do cigarro contém radicais livres em ambas as fases gasosa e sólida, e pode causar danos ao tecido por reação com os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares e com os nucleotídeos a nível de DNA (DIAB-LADKI, PELLAT E CHAHINE, 2003).

### 1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O radical livre é uma espécie química (átomo, íon ou molécula) que contém um número não pareado ou ímpar de elétrons na sua última camada, o que lhe confere alta reatividade. São formados, por exemplo, em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução (FERREIRA E MATSUBARA, 1997). Estão presentes no organismo humano e podem rapidamente modificar tanto moléculas pequenas e solúveis como vitaminas, aminoácidos, carboidratos e lipídeos, quanto macromoléculas como as proteínas e ácidos nucléicos, ou ainda membrana celular e lipoproteínas circulantes (JACOBSON,

1996). As fontes mais comuns de radicais livres em sistemas biológicos são o oxigênio e o nitrogênio (óxido nítrico), sendo chamados respectivamente de espécie reativa de oxigênio (ERO) e espécie reativa de nitrogênio (ERN) (BARREIROS, DAVID E DAVID, 2006). Além destes radicais livres existem espécies reativas do cloro, do enxofre e catalizadores das reações de radicais livres como os metais de transição (VASCONCELOS *ET AL.*, 2007).

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é essencial para a vida aeróbia, porém ele pode ser tóxico em determinadas condições. A este fenômeno se dá o nome de “paradoxo do oxigênio” (GILBERT, 2000). As reações de redução completa do oxigênio ocorrem principalmente nas mitocôndrias, onde maior parte deste é processado devido à respiração celular (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

Dentre as EROs é possível citar algumas características próprias de cada uma delas para um maior entendimento de como elas atuam no organismo. Como são diversas, serão ressaltadas as de maior importância e que estão incluídas na metodologia do trabalho (FIGURA 1).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), apesar de não ser um radical livre pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ). Em nosso organismo, os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação são o ferro e o cobre, sendo o ferro o mais biodisponível dentro do nosso sistema (BARREIROS, DAVID E DAVID, 2006). O  $H_2O_2$  é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência dos metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente. Possui vida longa e é capaz de reagir com a membrana eritrocitária

(FERREIRA E MATSUBARA, 1997). Este composto pode ser encontrado em bebidas como chás e principalmente café instantâneo e, rapidamente se difunde pelas células da cavidade oral e do trato gastrointestinal. É também produzido por bactérias presentes na boca, sendo utilizado pela peroxidase salivar para oxidar o tiocianeto ( $\text{SCN}^-$ ) em tiocianato ( $\text{OSCN}^-$ ), um produto tóxico para certas bactérias. Ele é utilizado pelos fagócitos na produção de ácidos hipoalogenosos, que são oxidantes muito efetivos no combate a vírus, bactérias e outros corpos estranhos, mas que por outro lado apresentam efeitos deletérios quando expostos às moléculas biológicas (HALLIWELL, CLEMENT E LONG, 2000).

O radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, é formado principalmente por 2 mecanismos. O primeiro é pela reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com metais de transição, principalmente o ferro, e o segundo é pela homólise da  $\text{H}_2\text{O}$  por exposição à radiação ionizante (BARREIROS, DAVID E DAVID, 2006; REUTER *ET AL.*, 2010). A combinação extremamente rápida do  $\cdot\text{OH}$  com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido mostram sua alta reatividade. Assim, se a hidroxila for produzida próximo ao DNA e a este DNA estiver unido a um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou à mutação do DNA, e consequentemente desencadeando à carcinogênese (REUTER *ET AL.*, 2010). Além disso, o  $\cdot\text{OH}$  pode inativar lipídios (BARREIROS, DAVID E DAVID, 2006) e várias proteínas (enzimas e membrana celular) ao oxidar seus grupos sulfidrilas ( $-\text{SH}$ ) (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1986). Por fim, pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos

polinsaturados das membranas celulares de núcleos e mitocôndrias através da peroxidação lipídica (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1986).

O oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) é a forma mais deletéria do oxigênio no organismo, pois é a causa ou o intermediário da toxicidade fotoinduzida do  $\text{O}_2$  em organismos vivos. Este reage com algumas classes de biomoléculas (-eno e -dieno) como os carotenoides, os ácidos nucléicos e, mais lentamente, com os ácidos graxos (BARREIROS, DAVID E DAVID, 2006).

O radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que se forma após a primeira redução do  $\text{O}_2$ , não é tão reativo e ocorre em quase todas as células aeróbicas sendo produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. É considerado pouco reativo em soluções aquosas (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1990). Apesar de efeitos danosos, o radical  $\text{O}_2^-$  tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções virais, bacterianas e fúngicas (BARREIROS, DAVID E DAVID, 2006).

O radical hidroperoxila ( $\text{HO}_2^-$ ) representa a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio. Existem evidências de que o hidroperoxila é mais reativo que o superóxido por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1990).

O ozônio ( $\text{O}_3$ ) produzido pelo ar atmosférico poluído e por fonte de luz intensa de alguns equipamentos é extremamente danoso ao pulmão e capaz de oxidar rapidamente proteínas, DNA e lipídeos (VASCONCELOS *ET AL.*, 2007).

## 1.4 AGENTES ANTIOXIDANTES

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Para Halliwell, “*Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*” (HALLIWELL, 2000). Os antioxidantes podem ser encontrados naturalmente em nosso organismo, em diversos alimentos e cosméticos. Estes são responsáveis pela proteção do organismo contra a ação oxidativa dos radicais livres e tem a função de inibir e/ou reduzir os danos deletérios causados pelas EROs. Eles são capazes de impedir a formação dos radicais livres, impedir a ação desses ou ainda, favorecer o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (HALLIWELL, 1995).

Os antioxidantes são classificados em enzimáticos e não enzimáticos, sendo que este último pode ser tanto produzido pelo organismo como adquirido pela dieta alimentar.

### 1.4.1 Antioxidantes enzimáticos

São representados principalmente pela superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathione redutase (GSH-Rd) e a glutathione peroxidase (GSH-Px) (BARREIROS, DAVID E DAVID, 2006; VASCONCELOS *ET AL.*, 2007). Estão presentes predominantemente no meio intracelular, daí a utilização principal do eritrócito para sua análise laboratorial (VASCONCELOS *ET AL.*, 2007). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou



controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

A GSH-Px catalisa a redução do  $H_2O_2$  e dos peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois à custa da conversão da GSH em GSSG (SHAN, AW E JONES, 1990). Após exposição da GSH a um agente oxidante, ocorre sua oxidação à GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima GSH-Rd, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. Habitualmente, a reserva intracelular de GSH-Rd é alta, e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos. A GSH-Rd é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses. Em condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) há prejuízo na função da GSH-Rd.

A superóxido dismutase (SOD) corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Em humanos existem duas formas de SOD: a forma Cu/Zn-SOD presente principalmente no citosol; e a Mn-SOD localizada na mitocôndria. (VASCONCELOS *ET AL.*, 2007).

A catalase é uma heme-proteína citoplasmática, encontrada no sangue, medula óssea e mucosas, que catalisa a redução do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  (FERREIRA E MATSUBARA, 1997). Está no peroxissoma, uma organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos,

fonte de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete (VASCONCELOS *ET AL.*, 2007).

#### 1.4.2 Antioxidantes não-enzimáticos

O grupo não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutathiona reduzida, o ácido úrico, a albumina, o estrogênio, a bilirrubina, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina e a ceruloplasmina. O organismo ainda utiliza aqueles provenientes da dieta como o *alpha*-tocoferol (vitamina-E),  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (BARREIROS, DAVID E DAVID, 2006; VASCONCELOS *ET AL.*, 2007). Localizam-se, principalmente, no meio extracelular, sendo por isso mais frequentemente analisado em plasma e soro (VASCONCELOS *ET AL.*, 2007).

A glutathiona é um antioxidante hidrossolúvel e encontra-se nas formas reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). Está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (MEISTER E ANDERSON, 1983). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, já que tem a função de destruir intermediários das EROs e dos radicais livres produzidos durante o metabolismo, protegendo-a contra lesões resultantes da exposição à agentes como íons ferro (GALLEANO E PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação, luz ultravioleta e certos medicamentos (MEISTER E

ANDERSON, 1983). Ela está presente em muitos processos biológicos, incluindo na síntese de proteínas e DNA, no transporte, na atividade enzimática, no metabolismo e na proteção celular, e por isso vem aumentando o interesse pelas suas propriedades e seu reflexo em diversos temas como metabolismo de medicamentos, câncer, toxicidade do oxigênio, imunidade, endocrinologia, toxinas advindas do ambiente e da idade (MEISTER E ANDERSON, 1983).

O ácido úrico, produto final do metabolismo das purinas, atua como antioxidante sequestrando radicais hidroxila, peroxila, oxigênio singlete e ozônio, e quelando o cobre e o ferro. Ele é produzido pela oxidação da hipoxantina em xantina. É considerado o maior antioxidante salivar seguido da albumina e do ácido ascórbico (DIAB-LADKI, PELLAT E CHAHINE, 2003).

A albumina é uma proteína sintetizada pelo fígado que reage com o cobre, impedindo-o de promover a lipoperoxidação e a formação de  $\cdot\text{OH}$ . Ela transporta os ácidos graxos livres e, associada à bilirrubina, evita a oxidação dos mesmos (DIAB-LADKI, PELLAT E CHAHINE, 2003).

A Vitamina C, ascorbato ou ácido ascórbico deve fazer parte da dieta alimentar, pois não pode ser sintetizado a partir da glicose que é seu precursor. No organismo está presente na forma de ascorbato ( $\text{Asc}^-$ ) e atua como agente redutor sobre o radical superóxido, peróxido de hidrogênio, hipoclorito, radical hidroxila e peroxila (VASCONCELOS *ET AL.*, 2007). O ácido ascórbico é um antioxidante hidrossolúvel que pode atuar diretamente nas membranas celulares, por impedir a iniciação da peroxidação lipídica (onde ocorre o ataque às proteínas das paredes dos vasos e artérias diminuindo o acúmulo de lipídios nas paredes e evitam o entupimento destas) ou indiretamente por regenerar a

vitamina-E, que atua como antioxidante na face lipofílica da membrana (BARREIROS, DAVID E DAVID, 2006).

A vitamina-E (tocoferol) confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a peroxidação lipídica. É um importante antioxidante lipofílico, mas esta função poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro. O  $\beta$ -caroteno, antioxidante precursor da vitamina-A, interage com os radicais livres especialmente quando ocorrem baixas tensões de  $O_2$ , enquanto que a vitamina-E se mostra mais eficiente quando há altas tensões de  $O_2$  no meio (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

#### 1.5 PESQUISAS RELACIONADAS COM OXIDANTES, ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO UTILIZANDO SALIVA

As biotecnologias emergentes tem expandido uma série de análises para o sistema fisiológico com base na saliva, pois a maioria dos componentes encontrados no sangue também estão presentes na saliva (SPIELMANN E WONG, 2011). Como um meio de análise, a saliva tem muitas vantagens: é fácil de coletar, armazenar e transportar, pode ser obtida a baixo custo e permite múltiplas análises (é reprodutível) (HOFMAN, 2001). Para os pacientes, as técnicas de coleta não-invasiva reduzem a ansiedade e o desconforto, e simplifica a obtenção de amostras em monitoramentos longitudinais. Para os profissionais, a coleta é mais segura, pois reduz o risco de acidentes perfuro-cortantes e exige menos treinamento. Além disso, é mais fácil de manusear e estocar, uma vez que não coagula (SEGAL E WONG, 2008).

Para desvendar a relação do estresse oxidativo e as diversas desordens foram, ao longo do tempo, desenvolvidas técnicas bioquímicas de amostragem que quantificam as substâncias envolvidas no sistema oxidante-antioxidante em diversos fluidos corporais (KORACEVIC *ET AL.*, 2001; EREL, 2004; TARPEY, WINK E GRISHAM, 2004; EREL, 2005; AKDAG *ET AL.*, 2014; BENEDETTI *ET AL.*, 2014). Os métodos mais utilizados para aferição indireta dos radicais livres e, conseqüentemente, das lesões oxidativas, são os espectrofotométricos e cromatográficos que medem separadamente a atividade enzimática da SOD, da catalase, da GSH-Px, da GSH-Rd e/ou a concentração dos tripeptídeos (GSH, GSSG) e dos aldeídos (como o MDA). Como exemplo, a peroxidação lipídica de membranas é habitualmente monitorada pelo método do MDA e o estresse oxidativo, por dosagens de GSSG e/ou pelo cálculo da razão GSSG/GSH (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

Como foi dito, as concentrações das diferentes espécies de oxidantes e antioxidantes podem ser medidas separadamente, porém são técnicas demoradas, trabalhosas, dispendiosas e complicadas (TARPEY, WINK E GRISHAM, 2004). Uma vez que as análises individuais não são práticas e que os seus efeitos são aditivos, alguns autores sugerem o estudo, respectivamente, do estado oxidante total (EOT) (HARMA E EREL, 2005) e da capacidade antioxidante total (CAT) (WAYNER *ET AL.*, 1985; EREL, 2004; SAYEDDA E AHMED, 2012; BENEDETTI *ET AL.*, 2014).

Nos anos 90, o grupo de Nicholas J. Miller em Londres desenvolveu um o teste de capacidade antioxidante total, que foi designado de “*total antioxidant capacity*” (TAC ou CAT). A principal vantagem deste teste é medir a capacidade antioxidante de virtualmente todos os componentes de uma

amostra biológica (sangue, saliva, urina, fezes), extrato vegetal ou alimento e não de somente um ou outro composto (FERRARI, 2010). E desde então, a CAT é vista como um biomarcador de estados do sistema redox no organismo (VASCONCELOS *ET AL.*, 2007).

Todos os tecidos são vulneráveis ao dano oxidativo, na cavidade oral, ele está relacionado com doenças, como por exemplo, a doença periodontal (AL-RAWI, 2011), leucoplasia (VLKOVÁ *ET AL.*, 2012), cárie (HEGDE, RAI E PADMANABHAN, 2009), dentre outros. A doença periodontal é considerada uma doença inflamatória caracterizada por um dano tecidual mediado pela interação de hospedeiros parasitas provocando perda de tecido conjuntivo e osso na região de raízes dentárias. O dano induzido pelos radicais livres na doença periodontal tem sido estudado por seu envolvimento na maioria das condições patológicas de origem inflamatória. Os leucócitos envolvidos na proteção do organismo contra as bactérias patogênicas liberam potentes EROs que destroem estas bactérias. Entretanto quando há um desequilíbrio biológico, estes radicais podem também danificar as células do próprio organismo, neste caso o tecido periodontal (DIAB-LADKI, PELLAT E CHAHINE, 2003).

Hegde *et al.* (2009) avaliaram a CAT em crianças com cárie da primeira infância e cárie rampante, e verificaram que há um aumento da CAT nas crianças com cárie em relação aos seus grupos controles. Os autores sugerem que os níveis aumentados de CAT se dão devido à resposta inflamatória por uma infecção ou uma doença que neste caso está presente pela cárie ou pela má higienização oral observada. Ressaltam também que a presença das peroxidases salivares controlam as bactérias causadoras da cárie. E por fim, verificaram que em crianças mais velhas a CAT tem níveis aumentados,

sugerindo para este resultado que as crianças mais velhas se alimentariam de comidas mais duras e com maiores quantidades de antioxidantes. E que o sistema imune vai se aprimorando a cada ano, melhorando suas respostas (HEGDE, RAI E PADMANABHAN, 2009).

Como todas as amostras biológicas, a saliva possui propriedades que devem ser mantidas durante sua preservação até o momento de sua análise. O método mais comum para isto é o congelamento e armazenamento das amostras na tentativa de inibir ao máximo a degradação de seus componentes.

Para tornar esse tipo de pesquisa confiável e comparável, se faz necessária a avaliação dos diversos processos congelamento e dos tempos de armazenamento das amostras. É muito comum que estas não sejam avaliadas imediatamente após a coleta, isso se deve a motivos como o tempo dispendido, falta de reagentes ou até mesmo de investimento. Assim, os biobancos, por sua vez, facilitam a estocagem de fluidos corporais, como o sangue, o soro, a saliva, o líquido cefalorraquidiano (HUBEL *ET AL.*, 2011; WILLEMSE *ET AL.*, 2015), o leite materno (AKDAG *ET AL.*, 2014) e a urina para análises posteriores (REMER, MONTENEGRO-BETHANCOURT E SHI, 2014).

Nos últimos anos, os pesquisadores têm tido um grande interesse em estabelecer protocolos padronizados de armazenamento salivar em biobancos, pois este se tornou relevante para o acompanhamento à longo prazo de amostras e, além disso, permite a pesquisa de novos biomarcadores para muitas doenças (WILLEMSE *ET AL.*, 2015). Pesquisas concretas que somem informações e ajudem a criar os protocolos são a chave para se obter amostras com alta qualidade e que sejam reprodutíveis (HUBEL *ET AL.*, 2011).

Hubel *et al.* (2011) realizaram uma revisão de literatura onde foram avaliadas as estabilidades de diversas substâncias do sangue, da urina, da saliva, do líquido cefalorraquidiano e do fluido pulmonar, e identificaram que para cada substância avaliada e para cada fluido deve se realizar um estudo individualizado, pois não existem protocolos para o armazenamento destes (HUBEL *ET AL.*, 2011).

As amostras biológicas são definidas como soluções complexas que congelam em diversas temperaturas. Durante o congelamento, a água é a primeira a se tornar sólida e os solutos, como proteínas e células, ficam separadas deste. Porém, a amostra só estará completamente congelada quando esta outra parte estiver solidificada. Ainda, a presença de matriz extracelular na amostra pode, por exemplo, influenciar no congelamento da água, mantendo esta líquida por mais tempo e levando à uma diminuição da estabilidade da amostra. Além disso, existem nas amostras moléculas degradadoras como as proteases, lipases e nucleases, que devem estar inativas durante o armazenamento para que não atuem mesmo em baixas temperaturas (HUBEL, SPINDLER E SKUBITZ, 2014).

A maioria dos antioxidantes são compostos por proteínas, principalmente os antioxidantes enzimáticos. Já se sabe que a temperatura tem uma forte influência na atividade das proteínas, onde temperaturas baixas resultam numa menor atividade. Este é um mecanismo pelo qual as amostras são estáveis à baixas temperaturas. A revisão que Hubel *et al.*, 2014 realizaram demonstrou que as proteínas até então estudadas, têm suas atividades mesmo em temperaturas muito baixas ( $< -80^{\circ}\text{C}$ ), o que leva a



concluir que existirá uma perda na propriedade das amostras avaliadas (HUBEL, SPINDLER E SKUBITZ, 2014).

Em projetos de pesquisas, o armazenamento de amostras é frequentemente utilizado por longos períodos de tempo, tanto pelo fato de fazer parte do protocolo do projeto, pela falta de recursos para a análises imediatas quanto para otimização do trabalho no laboratório. Atualmente, existe pouca consistência na literatura sobre a viabilidade da estocagem pré-análise da saliva, com garantia da manutenção de suas propriedades oxidantes e antioxidantes, para avaliação do estresse oxidativo.

## **2 OBJETIVO**

O objetivo deste estudo é analisar a preservação da capacidade antioxidante total, do estado oxidante total e do índice de estresse oxidativo da saliva nas temperaturas de armazenamento de -20°C e -80°C ao longo de 120 dias.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**

A coleta da saliva foi realizada com o consentimento dos participantes através do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) após apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná sob o número: 872583 (ANEXOS 1 e 2).

#### **3.2 COLETA DA SALIVA**

Foram recrutados participantes adultos saudáveis e como critérios de exclusão das amostras foram eliminados os participantes que fizessem o uso de medicamentos e complementos vitamínicos, os fumantes, os com xerostomia e que possuíam doenças sistêmicas e/ou doenças bucais.

Foram coletadas 16 amostras de saliva de indivíduos, de ambos os sexos, sadios e com idade entre 28 e 38 anos. A coleta salivar foi realizada no período compreendido entre as 8h00 e 10h00 da manhã. Para tal, os indivíduos realizaram a higienização oral e permaneceram em jejum por um período de 2 horas antes da coleta. O tempo da coleta foi de aproximadamente 10 minutos, sendo que os indivíduos coletaram a saliva estimulada, com auxílio do filme de parafina (Parafilm), em um recipiente esterilizado (Coletor Universal Estéril - J.PROLAB, 80 ml) e codificado, até atingir a marca de 10ml.

#### **3.3 ARMAZENAMENTO**

Após a coleta, a saliva foi centrifugada a  $9.030 \times G$  (10.000 rpm) durante 4 minutos. Então, uma alíquota de cada amostra foi utilizada para avaliação imediata e o restante da saliva foi separada em microtubos (Eppendorf – Life Sciences Biotechnology, 500 $\mu$ l) devidamente identificados, totalizando 10 microtubos por indivíduo. Por fim, um microtubo de cada paciente foi separado para análise imediata e os demais foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as avaliações posteriores, sendo descongelado um microtubo de cada temperatura por participante a cada tempo analisado (FIGURA 2).

### 3.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA

As amostras foram medidas aos T0, T15, T30, T45, T60, T90 e T120 dias após a coleta. Em cada tempo uma amostra armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$  de cada participante foi analisada em triplicata. As análises foram realizadas utilizando um leitor de microplaca (Universal Microplate Reader Elx 800, Bio-Tek instruments, inc.).

#### 3.4.1 Determinação do estado oxidante total (EOT)

O EOT foi determinado pelo método sugerido por Erel (EREL, 2005). Brevemente, uma alíquota de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo: 150 $\mu$ M de laranja de xilenol, 140 mM de NaCl, 25mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e 1,35M de glicerol. O pH da solução final foi 1,75. Posteriormente efetuou-se a leitura das amostras em leitor de microplaca a uma absorvância de 550nm. E então, foi adicionada uma alíquota de uma solução contendo:

5mM de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich®) e 10mM de o-dianisidina (Sigma-Aldrich®) em solução 25mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Após 4 minutos, tempo necessário para reação de oxidação, uma nova leitura foi realizada. A curva padrão foi feita com as concentrações referentes ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e os resultados determinados mediante a diferença das leituras e expressos em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equivalente/L.

Na reação, os oxidantes presentes na amostra oxidam o íon ferro do complexo íon-o-dianisidina a íon férrico. O íon férrico, então, forma um complexo com o xilenol (cor laranja) em meio ácido. A intensidade da cor, medida através do espectrofotômetro, está relacionada ao total de moléculas oxidantes presentes na amostra.

#### 3.4.2 Determinação da capacidade antioxidante total (CAT)

A CAT foi determinada pelo método sugerido por Erel (EREL, 2004). Brevemente, uma alíquota de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo 75mM de solução de Clark e Lubs (160ml de KCl (75mM) e 40 ml de HCl 37% (75mM), pH final 1,8), 10mM de o-dianisidina (Sigma-Aldrich®) e 45 $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich®). Posteriormente efetuou-se a leitura das amostras em leitor de microplaca a uma absorbância de 450nm. Foi então adicionada uma alíquota de reagente contendo solução 7,5mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e solução de Clark e Lubs, e após 4 minutos, tempo necessário para reação de oxidação, uma nova leitura foi realizada. A curva padrão foi feita com Trolox (Sigma-Aldrich®) em PBS 1X, diluído 1:9 e pH 7,4. Os

resultados foram determinados mediante a diferença das leituras e expressos em mmol Trolox equivalente/L.

Neste método, a hidroxila, o radical biológico mais potente, é produzido pela reação de Fenton e reage com o substrato incolor o-dianisidina para produzir o radical dianisidil, que tem uma cor marrom-amarelada. Sobre a adição da amostra, as reações oxidativas iniciadas pela hidroxila presente na mistura são interrompidas pelos componentes antioxidantes da amostra impedindo a mudança de cor e proporcionando assim a medição da CAT da amostra.

#### 3.4.3 Determinação do índice de estresse oxidativo (IEO)

O IEO é considerado como a relação entre o EOT e a CAT (HARMA E EREL, 2003). Para realizar o cálculo, a unidade do CAT foi ajustada de mmol de Trolox equivalente/L para  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalente/L. O valor do IEO é um valor arbitrário e calculado da seguinte forma:

$$\text{IEO} = \frac{\text{EOT}}{\text{CAT}} \times 100$$

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos ao teste ANOVA para medidas repetidas (Mauchly e Bonferroni), o teste t para comparação entre os grupos e a regressão linear. Foi utilizado o *Software Statistical Package for Social Science* - SPSS 20.0 (IBM, Chicago, IL) e escolhido o valor de  $p < 0,05$  para mostrar diferença entre os grupos.

**4 ARTIGO****DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO  
IDEAIS DA SALIVA PARA A AVALIAÇÃO DO ESTADO OXIDATIVO**

Título curto: Preservação do estado oxidativo salivar

Josi Karla Amadeu, Aline Louise Lemes, Juliana Lucena Schussel, José  
Miguel Amenábar Céspedes.

Recebido do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade  
Federal do Paraná. Curitiba, PR, Brasil.

**Endereço para correspondência:**

Josi Karla Amadeu

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do  
Paraná

Av. Pref. Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico

80210-170 Curitiba, PR.

E-mail: [jkamadeu@gmail.com](mailto:jkamadeu@gmail.com)

## Resumo

A saliva é um fluido utilizado para avaliar o estresse oxidativo (EO), através do estado oxidante total (EOT) e da capacidade antioxidante total (CAT). O EO é o desequilíbrio a favor das espécies oxidantes em relação aos antioxidantes presentes num meio capaz de causar diversos danos celulares como envelhecimento, câncer, doença periodontal, dentre outros. No entanto, não há uma padronização no que diz respeito a tempo e temperatura de armazenamento destes e da relação entre eles, denominada de índice de estresse oxidativo (IEO). O propósito deste estudo foi analisar a preservação da CAT, do EOT e do IEO salivares em duas temperaturas de armazenamento ao longo de 120 dias. Foram coletadas 16 amostras de pacientes saudáveis armazenadas a -20°C e a -80°C por 120 dias e analisadas nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120. Os resultados mostraram que as temperaturas foram capazes de manter as concentrações dos oxidantes e antioxidantes estáveis até 60 dias e após esse período, há uma perda destes componentes na saliva. Quando comparadas as temperaturas de armazenamento e o IEO, não foram observadas diferenças estatísticas significativas. Em conclusão, ambas as temperaturas são confiáveis para avaliação do estresse oxidativo na saliva no período de 60 dias.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Saliva. Preservação de amostras. Estado oxidativo. Oxidantes. Antioxidantes.



## **Introdução**

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e agentes antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes, levando a uma perturbação na sinalização e no controle redox e/ou dano molecular (1). Nestes casos, onde o organismo fica em desequilíbrio e as células são afetadas, inúmeras desordens sistêmicas podem ocorrer (2-5).

As biotecnologias emergentes tem expandido uma série de análises para o sistema fisiológico com base na saliva, pois a maioria dos componentes encontrados no sangue também estão presentes na saliva (6). Para desvendar a relação do estresse oxidativo e as diversas desordens foram, ao longo do tempo, desenvolvidas técnicas bioquímicas de amostragem que quantificam as substâncias envolvidas no sistema oxidante-antioxidante em diversos fluidos corporais (2; 7-11). Os métodos mais utilizados para aferição indireta dos radicais livres e, conseqüentemente, das lesões oxidativas, são os espectrofotométricos e cromatográficos que medem separadamente a atividade enzimática de antioxidantes (4), porém são técnicas demoradas, trabalhosas, dispendiosas e complicadas (10). Por isso, alguns autores defendem o estudo, respectivamente, do estado oxidante total (EOT) (12) e da capacidade antioxidante total (CAT) (2; 9; 13; 14).

É muito comum que as amostras não sejam avaliadas imediatamente após a coleta, isso se deve a motivos como o tempo despendido, a otimização do tempo laboratorial, a falta de reagentes ou até mesmo a falta de investimento. Os biobancos, por sua vez, vêm facilitando a estocagem de fluidos corporais, como o sangue, o soro, a saliva, o líquido cefalorraquidiano, (15; 16), o leite materno (7) e a urina para análises posteriores (17). Nos

últimos anos, os pesquisadores têm tido um grande interesse em estabelecer protocolos padronizados de armazenamento salivar em biobancos, pois este tornou-se relevante para o acompanhamento à longo prazo de amostras e, além disso, permite o estudo de novos biomarcadores para muitas doenças (15). Pesquisas concretas que somem informações e ajudem a criar os protocolos são a chave para se obter amostras com alta qualidade e que sejam reprodutíveis (16).

Porém, não existe na literatura estudos sobre a viabilidade da estocagem pré-análise salivar para avaliação do estresse oxidativo. Por esse motivo, o objetivo deste estudo é analisar a preservação do estado oxidativo da saliva nas temperaturas de armazenamento de -20°C e -80°C ao longo de 120 dias, de forma a estabelecer a melhor maneira para conservar o estado oxidante total, a capacidade antioxidante total e o índice do estresse oxidativo salivar em análises de forma que elas sejam mais confiáveis e comparáveis.

## **Materiais e Métodos**

### **Aprovação do comitê de Ética**

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná sob o número: 872583.

### **Coleta da Saliva**

Foram recrutados participantes adultos saudáveis e como critérios de exclusão das amostras foram eliminados os participantes que fizessem o uso de medicamentos e complementos vitamínicos, os fumantes, os com xerostomia e que possuíam doenças sistêmicas e/ou doenças bucais.

Foram coletadas 16 amostras de saliva de indivíduos, de ambos os sexos, sadios e com idade entre 28 e 38 anos. A coleta salivar foi realizada no período compreendido entre as 8h00 e 10h00 da manhã. Para tal, os indivíduos realizaram a higienização oral e permaneceram em jejum por um período de 2 horas antes da coleta. O tempo da coleta foi de aproximadamente 10 minutos, sendo que os indivíduos coletaram a saliva estimulada, com auxílio do filme de parafina (Parafilm), em um recipiente esterilizado (Coletor Universal Estéril - J.PROLAB, 80 ml) e codificado, até atingir a marca de 10ml.

### **Armazenamento**

Após a coleta, a saliva foi centrifugada a 10.000 rpm durante 4 minutos. Então, uma alíquota de cada amostra foi utilizada para avaliação imediata e o restante da saliva foi separada em microtubos (Eppendorf – Life Sciences Biotechnology, 500µl) devidamente identificados, totalizando 10 microtubos por indivíduo e armazenados a -20°C ou a -80°C para as avaliações posteriores, sendo descongelado um microtubo de cada temperatura por participante a cada tempo analisado (FIGURA 1).

### **Análise Bioquímica**

As amostras foram medidas aos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias após a coleta. Em cada tempo uma amostra armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$  de cada participante foi analisada em triplicata. As análises foram realizadas utilizando um leitor de microplaca (Universal Microplate Reader Elx 800, Bio-Tek instruments, inc.).

### **Determinação do estado oxidante total (EOT)**

O EOT foi determinado pelo método sugerido por Erel (8). Brevemente, uma alíquota de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo:  $150\mu\text{M}$  de laranja de xilenol,  $140\text{ mM}$  de  $\text{NaCl}$ ,  $25\text{mM}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $1,35\text{M}$  de glicerol. O pH da solução final foi 1,75. Posteriormente efetuou-se a leitura das amostras em leitor de microplaca a uma absorbância de  $550\text{nm}$ . E então, foi adicionada uma alíquota de uma solução contendo:  $5\text{mM}$  de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich®) e  $10\text{mM}$  de o-dianisidina (Sigma-Aldrich®) em solução  $25\text{mM}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Após 4 minutos, tempo necessário para reação de oxidação, uma nova leitura foi realizada. A curva padrão foi feita com as concentrações referentes ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e os resultados determinados mediante a diferença das leituras e expressos em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equivalente/L.

Na reação, os oxidantes presentes na amostra oxidam o íon ferro do complexo íon-o-dianisidina a íon férrico. O íon férrico, então, forma um complexo com o xilenol (cor laranja) em meio ácido. A intensidade da cor, medida através do espectrofotômetro, está relacionada ao total de moléculas oxidantes presentes na amostra.

### **Determinação da capacidade antioxidante total (CAT)**

A CAT foi determinada pelo método sugerido por Erel (2). Brevemente, uma alíquota de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo 75mM de solução de Clark e Lubs (160ml de KCl (75mM) e 40 ml de HCl 37% (75mM), pH final 1,8), 10mM de o-dianisidina (Sigma-Aldrich®) e 45µM de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich®). Posteriormente, efetuou-se a leitura das amostras em leitor de microplaca a uma absorbância de 450nm. Foi então adicionada uma alíquota de reagente contendo solução 7,5mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e solução de Clark e Lubs, e após 4 minutos, tempo necessário para reação de oxidação, uma nova leitura foi realizada. A curva padrão foi feita com Trolox (Sigma-Aldrich®) em PBS 1X, diluído 1:9 e pH 7,4. Os resultados foram determinados mediante a diferença das leituras e expressos em mmol Trolox equivalente/L.

Neste método, a hidroxila, o radical biológico mais potente, é produzido pela reação de Fenton e reage com o substrato incolor o-dianisidina para produzir o radical dianisidil, que tem uma cor marrom-amarelada. Sobre a adição da amostra, as reações oxidativas iniciadas pela hidroxila presente na mistura são interrompidas pelos componentes antioxidantes da amostra impedindo a mudança de cor e proporcionando assim a medição da CAT da amostra.

### **Determinação do índice de estresse oxidativo (IEO)**

O IEO é considerado como a relação entre o EOT e a CAT (18). Para realizar o cálculo, a unidade do CAT foi ajustada de mmol de Trolox equivalente/L para  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalente/L. O valor do IEO é um valor arbitrário e calculado da seguinte forma:

$$\text{IEO} = \frac{\text{EOT}}{\text{CAT}} \times 100$$

### **Análise estatística**

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos ao teste ANOVA para medidas repetidas (Mauchly e Bonferroni), o teste t para comparação entre os grupos e a regressão linear. Foi utilizado o *Software Statistical Package for Social Science* - SPSS 20.0 (IBM, Chicago, IL) e escolhido o valor de  $p < 0,05$  para mostrar diferença entre os grupos.

### **Resultados**

As amostras salivares foram divididas em 2 grupos, sendo um armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e outro armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  e avaliados nos tempos 0 (análise imediata), 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias após o congelamento. As amostras salivares consideradas foram de 16 para cada grupo e para cada tempo analisado, totalizando 208 amostras avaliadas em triplicata.

As curvas padrão para o EOT e a CAT foram realizadas a cada medição e foram consideradas ótimas para a análise quando o  $R^2 \geq 0,98$ . A média da concentração e o desvio padrão dos oxidantes e antioxidantes como também o

IEO nas temperaturas de -20°C e -80°C estão apresentados nas TABELAS 1 e 2 respectivamente.

A saliva armazenada a -20°C mostrou perda na concentração de oxidantes totais nos primeiros 30 dias. Posteriormente houve uma estabilização por 30 dias (T60) e, a partir desse momento, a saliva começa a perder novamente oxidantes. O teste de esfericidade de Mauchly indicou que a suposição de esfericidade não se cumpriu para o efeito da concentração de oxidantes armazenados a -20°C ao longo do tempo ( $\chi^2(20)=33,79$ ,  $p=0,031$ ); por esse motivo os graus de liberdade foram corrigidos com a estimação de esfericidade de Greenhouse-Geisser ( $\epsilon = 0,643$ ). A concentração de oxidantes totais foi afetada nos diferentes intervalos de armazenamento,  $F(11,26, 2,21)=5,09$ ,  $p=0,002$ ,  $\eta^2_p=0,253$ . Porém, o teste entre pares de Boferroni mostrou diferenças estatísticas somente entre o T0 com o T90 e T120 ( $p=0,02$  e  $p=0,01$ , respectivamente) (TABELA 1).

Já a saliva armazenada a -80°C manteve a concentração de oxidantes totais estável do T0 até o T60. A partir dos 60 dias a saliva começa a perder oxidantes. O teste de esfericidade de Mauchly indicou que a suposição de esfericidade não se cumpriu para o efeito da concentração de oxidantes ao longo do tempo de armazenamento ( $\chi^2(20)=38,69$ ,  $p=0,009$ ); por esse motivo os graus de liberdade foram corrigidos com a estimação de esfericidade de Greenhouse-Geisser ( $\epsilon = 0,628$ ). A concentração de oxidantes totais foi afetada nos diferentes intervalos de armazenamento,  $F(12,08, 2,11)=5,716$   $p=0,001$ ,  $\eta^2_p=0,276$ . O teste entre pares de Boferroni mostrou diferenças estatísticas entre o T0, T45 e T60 com o T90 ( $p=0,007$ ,  $p=0,001$  e  $p=0,03$

respectivamente) e T0, T45 com o T120 ( $p=0,043$  e  $p=0,001$  respectivamente) (TABELA 2).

As duas temperaturas de armazenamento foram capazes de conservar os oxidantes estáveis até 60 dias. Após essa data houve uma queda na concentração avaliada para ambas as temperaturas, mostrando que começa a haver uma perda deste componente na saliva (GRÁFICO 1a.).

Quando comparadas as diferentes temperaturas de armazenamento em cada tempo, não foram observadas diferenças significativas, sugerindo que ambas as temperaturas preservam os oxidantes da mesma forma.

No que diz respeito à antioxidantes totais, a concentração destes a  $-20^{\circ}\text{C}$  mostrou perda ao longo do período. Nos primeiros 30 dias aconteceu uma perda maior e após este tempo, as concentrações continuaram diminuindo, porém, a perda não foi tão rápida. O teste de esfericidade de Mauchly indicou que a suposição de esfericidade se cumpriu para o efeito da concentração de antioxidantes ao longo do tempo de armazenamento ( $\chi^2(20)=27,36$ ,  $p>0,05$ ). A concentração de antioxidantes totais foi afetada nos diferentes intervalos de armazenamento,  $F(5,71, 2,13)=2,67$ ,  $p=0,02$ ,  $\eta^2_p=0,151$ . O teste entre pares de Boferroni mostrou diferenças estatísticas apenas entre o T0 e com o T90 e T120 ( $p=0,012$  em ambos os casos) (TABELA 1).

Da mesma forma, a concentração de antioxidantes totais armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  também mostrou perda nos primeiros 30 dias. Posteriormente a concentração se manteve estável até os 60 dias e a partir desse momento voltou a cair. O teste de esfericidade de Mauchly indicou que a suposição de esfericidade não se cumpriu para o efeito da concentração de antioxidantes ao



longo do tempo de armazenamento ( $\chi^2(20)=57,30$ ,  $p<0,001$ ); por esse motivo os graus de liberdade foram corrigidos com a estimação de esfericidade de Huynh-Feldt ( $\epsilon = 0,703$ ). A concentração de antioxidantes totais foi afetada nos diferentes intervalos de armazenamento,  $F(17,025, 2,50)=6,80$ ,  $p<0,001$ ,  $\eta^2_p=0,312$ . O teste entre pares de Boferroni mostrou diferenças estatísticas entre todos os tempos com o T90 ( $p<0,05$ ), exceto no T45 e T60; e o T0 com o T120 ( $p<0,001$ ) (TABELA 2).

Sendo assim, houve perda na concentração de antioxidantes em ambas as temperaturas sinalizando uma mesma qualidade de armazenamento até 60 dias (GRÁFICO 1b.). A partir deste ponto, ambas as temperaturas de armazenamento começaram a mostrar diferenças nas concentrações dos antioxidantes. Quando comparadas as diferentes temperaturas de armazenamento para cada tempo não foram encontradas diferenças significativas.

Por fim, quando foi verificado o IEO (GRÁFICO 2), este tende a aumentar ao longo do tempo de armazenamento em ambas as temperaturas, mas sem diferenças estatísticas significativas. Além disso, foi observado que os valores de IEO sempre são maiores no caso das amostras armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$ .

## **Discussão**

Diversas substâncias presentes na saliva são instáveis a temperatura ambiente, e manter a amostra resfriada após a coleta é muito importante, pois nem sempre as análises podem ser feitas no momento da coleta. Porém, não

há consenso sobre a melhor temperatura para armazenamento da saliva quando utilizada para análise do estresse oxidativo. Este estudo é o primeiro a avaliar a preservação dos níveis de EOT, CAT e IEO salivares a temperatura ambiente (imediatamente após a coleta) e estocada a -20°C e -80°C ao longo de 120 dias.

No presente estudo, as concentrações de oxidantes e antioxidantes salivares diminuem significativamente após 60 dias de armazenamento em ambas temperaturas de -20°C e -80°C. Isto significa, que até este tempo e para as substâncias analisadas, as duas temperaturas são capazes de preservar satisfatoriamente as amostras de saliva. Este resultado é relevante pois nem todos os laboratórios possuem acesso a freezers com temperaturas de -80°C devido ao seu alto custo de compra e manutenção.

Um estudo recente de Willemse *et al.* (15) mostrou que não houve perda de volume salivar quando estas foram armazenadas por um período de 2 anos às temperaturas de -20°C e -80°C. Este resultado sugere que as perdas ocorridas ao longo do tempo não se devem ao volume salivar e sim às propriedades das substâncias presentes nela.

A maioria dos antioxidantes são compostos por proteínas, principalmente os antioxidantes enzimáticos. Já se sabe que a temperatura tem uma forte influência na atividade das proteínas, sendo que temperaturas baixas resultam em atividade proteica reduzida, favorecendo a estabilidade das amostras em baixas temperaturas (16). Ainda os mesmos autores, Hubel *et al.* (16) em uma revisão, avaliaram diversos fluidos dentre eles a urina, a saliva e o sangue e mostraram que diferentes condições de coleta e armazenamento têm grandes efeitos na estabilidade de proteínas, o que levaria a erros de

interpretação dos resultados obtidos e consequentemente à conclusões inválidas.

As proteínas estão susceptíveis aos danos causados pelas EROs. No presente estudo, os oxidantes avaliados através do estado oxidante total permaneceram sem perdas significativas até 60 dias quando armazenados em ambas as temperaturas. No entanto, Matteucci *et al.* (19) ao medirem os produtos da oxidação das proteínas em pacientes hospitalizados obtiveram resultados diferentes. Os autores coletaram amostras de sangue que foram avaliadas imediatamente após a coleta, nos dias 7, 15, 30, 90, 180 e 438 e armazenadas a -20°C e a -80°C. E verificaram que as proteínas ficaram estáveis se armazenadas em ambas as temperaturas por até 6 meses. A diferença do resultado com o presente estudo pode se dar devido ao fluido analisado, já que eles avaliaram as concentrações presente no sangue. Já, o presente estudo, no qual se utilizou a saliva, a perda observada ao longo do tempo e precocemente, podendo ser justificada pela grande presença de proteases salivares que causam degradação as proteínas.

Em 2012, Qing *et al.* (20) avaliaram os produtos da oxidação das proteínas em saliva e em plasma sanguíneo. As amostras salivares foram analisadas imediatamente após a coleta, aos 7, 14, 21 e 28 dias, armazenadas a -20°C e a -80°C. Também obtiveram resultados diferentes, porém com relação às temperaturas. Eles verificaram que os níveis de oxidação das proteínas salivares variaram significativamente à temperatura de -20°C e permaneceu mais estável à -80°C, sugerindo que a temperatura de -20°C não seria apropriada para a armazenagem. E para a temperatura de -80°C os

resultados se mantiveram mais estáveis e compatíveis com o resultado obtido na análise do plasma armazenados até 4 semanas.

A revisão de Hubel *et al.*, 2014 (21) demonstrou que para as proteínas até então estudadas, as suas atividades persistem em temperaturas muito baixas ( $< -80^{\circ}\text{C}$ ), o que leva a concluir que existirá uma perda na propriedade das amostras avaliadas. Uma vez que os antioxidantes são compostos principalmente de proteínas, a degradação proteica pode ser responsável pela diminuição nas concentrações dos antioxidantes ao longo dos 120 dias. Curiosamente há uma variação nas concentrações, com um aumento de oxidantes e antioxidantes em alguns momentos analisados entre o T0 e o T120. Isto foi relatado por outros autores (22) porém não se sabe o motivo pelo qual este fenômeno ocorre.

Emekli-Alturfan, *et al.* (22) avaliaram os níveis de GSH e de peroxidação lipídica no momento da coleta da saliva e em amostras armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  nos tempos de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após a coleta, e concluíram que o tempo de armazenamento ideal da saliva a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a determinação da peroxidação lipídica é de até 30 dias. No entanto, não foi possível determinar o tempo ideal para avaliação da GSH. Já, o presente estudo obteve uma estabilidade maior, de até 60 dias, porém avaliou o EOT e não somente a peroxidação lipídica.

A determinação do estresse oxidativo durante o armazenamento já foi realizado em outros fluidos corporais como a urina (17), o leite materno (7; 23) e sangue (19; 20). Remer *et al.* (17) armazenaram a urina por um período de 15 anos e verificaram que, dependendo da substância a ser analisada, a urina tem alta estabilidade a  $-22^{\circ}\text{C}$ , a exemplo do ácido úrico, um antioxidante não-

enzimático, para o qual o armazenamento foi eficaz e manteve suas propriedades. Isto também ocorreu com grande parte dos metabólitos analisados. Porém, outras substâncias, como o oxalato, apresentaram perdas ao longo do tempo e para a preservação destas os autores sugerem a adição de conservantes na amostra a ser armazenada. Dessa maneira, é importante que para cada substância a ser analisada, seja observado o melhor método de armazenagem, para que este não interfira nos resultados finais. Por outro lado, quando se analisa o todo, com relação ao estado oxidante total e a capacidade antioxidante total como na presente pesquisa, estes ficaram estáveis ao longo de 60 dias. Para IEO não houve perdas, sugerindo um equilíbrio entre os dois componentes das amostras, mantendo-o estável.

Akdag *et al.* (7) avaliaram a estabilidade da CAT presente no leite materno armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 3 meses e verificaram que este se manteve estável sem perdas significativas. Silvestre *et al.* (24) avaliaram a atividade da glutathione peroxidase e a concentração de MDA no leite materno em 2 temperaturas ( $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ ) nos diferentes tempos de armazenamento de 15, 30, e 60 dias e como resultado verificaram que o congelamento induz a perda das propriedades antioxidantes e que esta aumenta com o tempo de estocagem, e sugere que as amostras armazenadas por um curto período podem ser estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e as que ficariam por um período de até 30 dias sejam armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O mesmo acontece com os antioxidantes salivares analisados no presente estudo, onde se verificou uma perda de suas propriedades ao longo do tempo.

Buss *et al.* (23) avaliaram a vitamina C, um antioxidante não-enzimático, no leite materno logo após a sua coleta e armazenado no refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$

por 24 horas e em freezer a  $-16^{\circ}\text{C}$  por 2 meses e verificaram que há uma perda da vitamina C durante o tempo de armazenamento, sendo que o refrigerador por 24 horas e o freezer por 1 mês são capazes de conservar apenas 2/3 da vitamina presente inicialmente.

Apesar da existência de estudos, como os citados, que avaliam substâncias relacionadas ao estresse oxidativo em diversos fluidos, a saliva têm sido um fluido de escolha pelos pesquisadores pois ela reflete praticamente todo o espectro de estado normal e de doença de um indivíduo (25) já que a maioria dos componentes encontrados no sangue também estão presentes na saliva (6). Çaglayan *et al.* (26) ainda relatam que a saliva é a primeira defesa contra o estresse oxidativo, pois a função da mastigação pode causar a peroxidação lipídica.

Como um meio de análise, a saliva tem muitas vantagens: é fácil de coletar, armazenar e transportar, pode ser obtida a baixo custo e permite múltiplas análises passíveis de reprodução (25). Para os pacientes, as técnicas de coleta não-invasiva reduzem a ansiedade e o desconforto, e simplifica a obtenção de amostras para monitoramentos longitudinais. Para os profissionais, a coleta é mais segura, pois reduz o risco de acidentes perfuro-cortantes e exige menos treinamento. Além disso, é mais fácil de manusear e estocar, uma vez que não coagula (27).

Vários métodos foram desenvolvidos para a avaliação do EOT e da CAT, porém não existe uma referência padrão ouro. Questões como a própria padronização de um método, os termos a serem utilizados e as unidades ainda não foram resolvidas. Os métodos escolhidos para análise das substâncias foram os sugeridos por Erel (2; 8). Estes métodos de Erel são os únicos

relatados que, além de avaliar os oxidantes e os antioxidantes, através do estado oxidante total e da capacidade oxidante total, também permitem avaliar o índice de estresse oxidativo. Este índice tende a ser utilizado cada vez mais pois o estresse oxidativo não se caracteriza somente pelo aumento ou diminuição dos oxidantes ou antioxidantes e sim a relação entre eles. Apesar de ser um método sensível que requer prática e treinamento, seus reagentes podem ser confeccionados pelo próprio pesquisador, em seu laboratório, com baixo custo e sem necessidade de adquirir kits industrializados que podem ser bem custosos e encarecer a pesquisa. Pode ser realizado de maneira rápida, muitas amostras podem ser analisadas ao mesmo tempo e tem uma validade de seus reagentes, entre 1 e 6 meses, considerada relativamente grande quando comparada com outros métodos para oxidantes, onde seus reagentes dura apenas 6 horas (28).

### **Considerações finais**

Foi verificado que a preservação do estado oxidante total e a capacidade antioxidante total salivares ocorre em amostras armazenadas até 60 dias, independentemente da temperatura, sendo confiáveis para análise. Após este período, até os 120 dias analisados, ocorre uma perda significativa de oxidantes e antioxidantes presentes na saliva mostrando que amostras armazenadas por um período longo são inadequadas para a avaliação e comparação do estresse oxidativo. Com relação ao índice do estresse oxidativo, não há diferença entre as temperaturas ao longo do tempo.

## Referências Bibliográficas

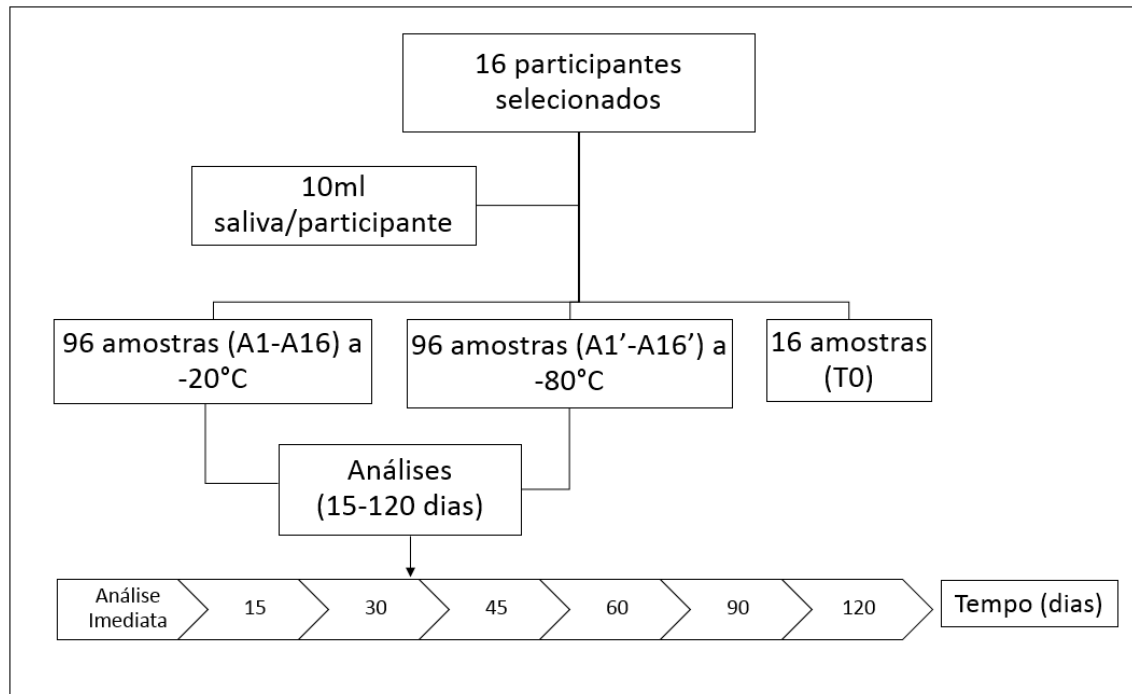
1. Fink G. 2007. Encyclopedia of Stress. Sies HJ, D., editor. New York: Academic Press.
2. Erel O. 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 37(2):112-119.
3. Gutteridge JM, Halliwell B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 899:136-147.
4. Ferreira AL, Matsubara LS. 1997. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. *Rev Assoc Med Bras* 43(1):61-68.
5. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 49(11):1603-1616.
6. Spielmann N, Wong DT. 2011. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis* 17(4):345-354.
7. Akdag A, Sari FN, Dizdar EA, Uras N, Isikoglu S, Erel O, Dilmen U. 2014. Storage at -80°C preserves the antioxidant capacity of preterm human milk. *J Clin Lab Anal* 28(5):415-418.
8. Erel O. 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38(12):1103-1111.
9. Benedetti S, Primiterra M, Finco A, Canestrari F, Cornelli U. 2014. Validation of a patented method to determine the antioxidant capacity of human saliva based on the reduction of iron: the SAT test. *Clin Lab* 60(3):475-482.
10. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(3):R431-444.
11. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. 2001. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* 54(5):356-361.
12. Harma M, Erel O. 2005. Oxidative stress in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 192(2):656-657; author reply 657.
13. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Locke S. 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett* 187(1):33-37.
14. Sayedda K, Ahmed KS. 2012. Salivary total antioxidant activity as a non invasive biomarker for oxidative stress in asthmatic patients. *National Journal of Integrated Research in Medicine* 3:8-12.
15. Willemse EA, Koel-Simmelink MJ, Durieux-Lu S, van der Flier WM, Teunissen CE. 2015. Standard biobanking conditions prevent evaporation of body fluid samples. *Clin Chim Acta* 442:141-145.
16. Hubel A, Aksan A, Skubitz AP, Wendt C, Zhong X. 2011. State of the art in preservation of fluid biospecimens. *Biopreserv Biobank* 9(3):237-244.



17. Remer T, Montenegro-Bethancourt G, Shi L. 2014. Long-term urine biobanking: storage stability of clinical chemical parameters under moderate freezing conditions without use of preservatives. *Clin Biochem* 47(18):307-311.
18. Harma M, Erel O. 2003. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly* 133(41-42):563-566.
19. Matteucci E, Biasci E, Giampietro O. 2001. Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. *Acta Diabetol* 38(4):187-189.
20. Qing Z, Ling-Ling E, Dong-Sheng W, Hong-Chen L. 2012. Relationship of advanced oxidative protein products in human saliva and plasma: age- and gender-related changes and stability during storage. *Free Radic Res* 46(10):1201-1206.
21. Hubel A, Spindler R, Skubitz AP. 2014. Storage of human biospecimens: selection of the optimal storage temperature. *Biopreserv Biobank* 12(3):165-175.
22. Emekli-Alturfan E, Kasikci E, Alturfan AA, Pisiriciler R, Yarat A. 2009. Effect of sample storage on stability of salivary glutathione, lipid peroxidation levels, and tissue factor activity. *J Clin Lab Anal* 23(2):93-98.
23. Buss IH, McGill F, Darlow BA, Winterbourn CC. 2001. Vitamin C is reduced in human milk after storage. *Acta Paediatr* 90(7):813-815.
24. Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Romero FJ. 2010. Frozen breast milk at -20 degrees C and -80 degrees C: a longitudinal study of glutathione peroxidase activity and malondialdehyde concentration. *J Hum Lact* 26(1):35-41.
25. Hofman LF. 2001. Human saliva as a diagnostic specimen. *J Nutr* 131(5):1621S-1625S.
26. Çağlayan F, Miloglu O, Altun O, Erel O, Yilmaz AB. 2008. Oxidative stress and myeloperoxidase levels in saliva of patients with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis* 14(8):700-704.
27. Segal A, Wong DT. 2008. Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. *Eur J Dent Educ* 12 Suppl 1:22-29.
28. Gay CA, Gebicki JM. 2003. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xyleneol orange method. *Anal Biochem* 315(1):29-35.

**FIGURA**

FIGURA 1. TOTAL DE AMOSTRAS ANALISADAS.



## TABELAS

TABELA 1. A MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO E DESVIO PADRÃO DOS OXIDANTES, ANTIOXIDANTES E O ÍNDICE DO ESTRESSE OXIDATIVO A TEMPERATURA DE -20°C.

	<b>T0</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T15</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T30</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T45</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T60</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T90</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T120</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>
<b>Estado</b>							
<b>oxidante</b>	3,28	3,55	2,79	2,88	2,88	1,84	1,78
<b>total (µM)</b>	(1,78) <sup>a,b</sup>	(1,04)	(1,51)	(1,76)	(1,11)	(0,78) <sup>a</sup>	(0,70) <sup>b</sup>
<b>Capacidade</b>							
<b>antioxidante</b>	3,53	3,71	2,80	2,78	2,44	2,39	2,09
<b>total (mM)</b>	(0,72) <sup>c,d</sup>	(1,21)	(1,66)	(1,81)	(2,09)	(1,29) <sup>c</sup>	(1,51) <sup>d</sup>
<b>Índice de</b>							
<b>estresse</b>	0,093	0,096	0,100	0,104	0,118	0,0767	0,0852
<b>oxidativo</b>							

\*Letras iguais indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

TABELA 2. A MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO E DESVIO PADRÃO DOS OXIDANTES, ANTIOXIDANTES E O ÍNDICE DO ESTRESSE OXIDATIVO A TEMPERATURA DE -80°C.

	<b>T0</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T15</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T30</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T45</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T60</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T90</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T120</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>
<b>Estado</b>							
<b>oxidante</b> <b>total (µM)</b>	3,28 (1,78) <sup>a,b</sup>	3,40 (1,55)	3,31 (1,25)	3,34 (1,58) <sup>e</sup>	3,53 (0,76) <sup>c,d</sup>	1,99 (1,27) <sup>a,c,e</sup>	1,94 (0,76) <sup>b,d</sup>
<b>Capacidade</b>							
<b>antioxidante</b> <b>total (mM)</b>	3,53 (0,72) <sup>f,g</sup>	3,24 (1,16) <sup>h</sup>	2,48 (1,56) <sup>i</sup>	2,68 (2,21)	2,55 (1,79)	2,59 (1,48) <sup>f,h,i,j</sup>	1,79 (1,00) <sup>g,j</sup>
<b>Índice de</b> <b>estresse</b> <b>oxidativo</b>	0,093	0,105	0,133	0,125	0,138	0,0768	0,108

\*Letras iguais indicam diferença estatística significativa (p<0,05).

## GRÁFICOS

GRÁFICO 1. (a) MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO DOS OXIDANTES NAS DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE 120 DIAS. (b) MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES NAS DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE 120 DIAS.

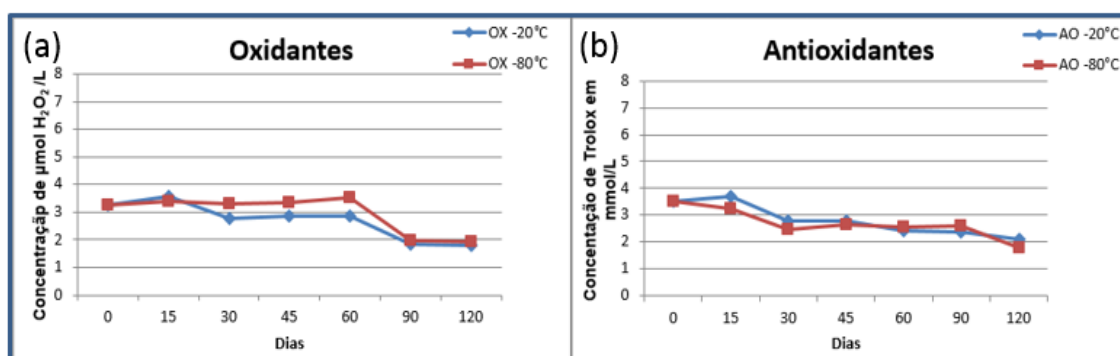
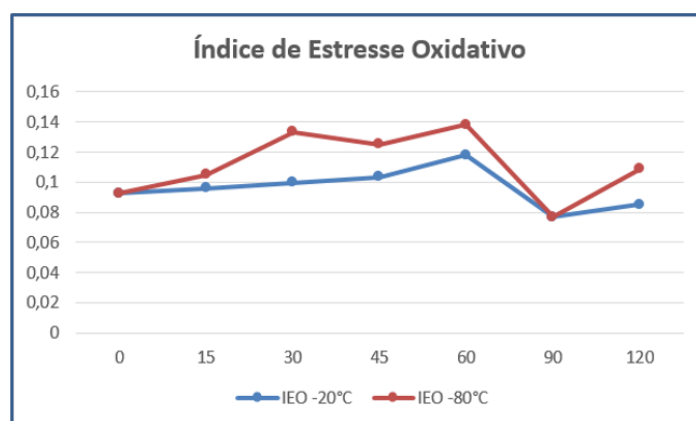


GRÁFICO 2. ÍNDICE DE ESTRESSE OXIDATIVO AO LONGO DOS 120 DIAS.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foi proposta uma metodologia simples, já descrita na literatura e com algumas adaptações, para a avaliação da conservação do estado oxidativo em saliva durante 120 dias nas temperaturas de -20°C e -80°C. Foi verificado que a preservação do estado oxidante total e a capacidade antioxidante total salivares ocorre em amostras armazenadas até 60 dias, independentemente da temperatura, sendo confiáveis para análise. Após este período, e até os 120 dias, começa a haver uma perda significativa de oxidantes e antioxidantes presentes na saliva mostrando que amostras armazenadas por um período maior que 60 dias são inadequadas para a avaliação e comparação do estresse oxidativo. Com relação ao índice do estresse oxidativo, não há diferença entre as temperaturas ao longo do tempo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKDAG, A. et al. Storage at -80°C preserves the antioxidant capacity of preterm human milk. **J Clin Lab Anal**, v. 28, n. 5, p. 415-8, Sep 2014. ISSN 1098-2825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24652589> >.

AL-RAWI, N. H. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. **Diab Vasc Dis Res**, v. 8, n. 1, p. 22-8, Jan 2011. ISSN 1752-8984. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21262867> >.

ARANA, C. et al. Parameters of oxidative stress in saliva from diabetic and parenteral drug addict patients. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 9, p. 554-9, Oct 2006. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968236> >.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, 2006.

BENEDETTI, S. et al. Validation of a patented method to determine the antioxidant capacity of human saliva based on the reduction of iron: the SAT test. **Clin Lab**, v. 60, n. 3, p. 475-82, 2014. ISSN 1433-6510. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24697125> >.

BLAKE, D. R. et al. Iron free radicals and arthritis. **Proc Nutr Soc**, v. 49, n. 2, p. 239-45, Jul 1990. ISSN 0029-6651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2236089> >.

BUSS, I. H. et al. Vitamin C is reduced in human milk after storage. **Acta Paediatr**, v. 90, n. 7, p. 813-5, Jul 2001. ISSN 0803-5253. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11519987> >.

CAĞLAYAN, F. et al. Oxidative stress and myeloperoxidase levels in saliva of patients with recurrent aphthous stomatitis. **Oral Dis**, v. 14, n. 8, p. 700-4, Nov 2008. ISSN 1601-0825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19193199> >.

CHIAPPIN, S. et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clin Chim Acta**, v. 383, n. 1-2, p. 30-40, Aug 2007. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512510> >.

CRYSTAL, R. G. Oxidants and respiratory tract epithelial injury: pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. **Am J Med**, v. 91, n. 3C, p. 39S-44S,

Sep 1991. ISSN 0002-9343. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1928210> >.

DIAB-LADKI, R.; PELLAT, B.; CHAHINE, R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. **Clin Oral Investig**, v. 7, n. 2, p. 103-7, Jun 2003. ISSN 1432-6981. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12743837> >.

EMEKLİ-ALTURFAN, E. et al. Effect of sample storage on stability of salivary glutathione, lipid peroxidation levels, and tissue factor activity. **J Clin Lab Anal**, v. 23, n. 2, p. 93-8, 2009. ISSN 1098-2825. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19288453> >.

\_\_\_\_\_. Determination of storage time of saliva samples obtained from patients with and without chronic periodontitis for the comparison of some biochemical and cytological parameters. **J Clin Lab Anal**, v. 27, n. 4, p. 261-6, Jul 2013. ISSN 1098-2825. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23852781> >.

EREL, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. **Clin Biochem**, v. 37, n. 2, p. 112-9, Feb 2004. ISSN 0009-9120. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14725941> >.

\_\_\_\_\_. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clin Biochem**, v. 38, n. 12, p. 1103-11, Dec 2005. ISSN 0009-9120. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214125> >.

FERRARI, C. K. B. Capacidade antioxidante total (CAT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais **J Health Sci Inst.**, v. 28, 2010.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997 Jan-Mar 1997. ISSN 0104-4230. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224995> >.

FINK, G. **Encyclopedia of Stress**. Second Edition. New York: Academic Press, 2007.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochim Biophys Acta**, v. 1271, n. 2-3, p. 321-6, Jun 1995. ISSN 0006-3002. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7605798> >.



GAY, C. A.; GEBICKI, J. M. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylenol orange method. **Anal Biochem**, v. 315, n. 1, p. 29-35, Apr 2003. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672409> >.

GILBERT, D. L. Fifty years of radical ideas. **Ann N Y Acad Sci**, v. 899, p. 1-14, 2000. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863525> >.

GOW, A. J.; ISCHIROPOULOS, H. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. **J Cell Physiol**, v. 187, n. 3, p. 277-82, Jun 2001. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319751> >.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann N Y Acad Sci**, v. 899, p. 136-47, 2000. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863535> >.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochem Pharmacol**, v. 49, n. 10, p. 1341-8, May 1995. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7763275> >.

\_\_\_\_\_. The antioxidant paradox. **Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179-80, Apr 2000. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10791396> >.

\_\_\_\_\_. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, v. 97, n. 6, p. 1634-58, Jun 2006. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805774> >.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Lett**, v. 486, n. 1, p. 10-3, Dec 2000. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11108833> >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**, v. 246, n. 2, p. 501-14, May 1986. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3010861> >.

\_\_\_\_\_. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2172697> >.

HARMA, M.; EREL, O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. **Swiss Med Wkly**, v. 133, n. 41-42, p. 563-6, Nov 2003. ISSN 1424-7860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691728> >.

\_\_\_\_\_. Oxidative stress in women with preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 192, n. 2, p. 656-7; author reply 657, Feb 2005. ISSN 0002-9378. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15696019> >.

HEGDE, A. M.; RAI, K.; PADMANABHAN, V. Total antioxidant capacity of saliva and its relation with early childhood caries and rampant caries. **J Clin Pediatr Dent**, v. 33, n. 3, p. 231-4, 2009. ISSN 1053-4628. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19476096> >.

HOFMAN, L. F. Human saliva as a diagnostic specimen. **J Nutr**, v. 131, n. 5, p. 1621S-5S, May 2001. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11340128> >.

HORTON, R.; RICE-EVANS, C.; FULLER, B. J. The effects of iron-mediated oxidative stress in isolated renal cortical brush border membrane vesicles at normothermic and hypothermic temperatures. **Free Radic Res Commun**, v. 5, n. 4-5, p. 267-75, 1989. ISSN 8755-0199. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2707628> >.

HUBEL, A. et al. State of the art in preservation of fluid biospecimens. **Biopreserv Biobank**, v. 9, n. 3, p. 237-44, Sep 2011. ISSN 1947-5535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24850337> >.

HUBEL, A.; SPINDLER, R.; SKUBITZ, A. P. Storage of human biospecimens: selection of the optimal storage temperature. **Biopreserv Biobank**, v. 12, n. 3, p. 165-75, Jun 2014. ISSN 1947-5543. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24918763> >.

JACOBSON, M. D. Reactive oxygen species and programmed cell death. **Trends Biochem Sci**, v. 21, n. 3, p. 83-6, Mar 1996. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8882579> >.

KORACEVIC, D. et al. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. **J Clin Pathol**, v. 54, n. 5, p. 356-61, May 2001. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328833> >.

LACHANCE, P. A.; NAKAT, Z.; JEONG, W. S. Antioxidants: an integrative approach. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 835-8, Oct 2001. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684390> >.

MATTEUCCI, E.; BIASCI, E.; GIAMPIETRO, O. Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. **Acta Diabetol**, v. 38, n. 4, p. 187-9, Dec 2001. ISSN 0940-5429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11855797> >.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu Rev Biochem**, v. 52, p. 711-60, 1983. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6137189> >.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem J**, v. 218, n. 1, p. 273-5, Feb 1984. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6712613> >.

MINOTTI, G.; AUST, S. D. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. **J Biol Chem**, v. 262, n. 3, p. 1098-104, Jan 1987. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3027077> >.

MOORE, S. et al. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. **Free Radic Res**, v. 21, n. 6, p. 417-25, 1994 Nov-Dec 1994. ISSN 1071-5762. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834056> >.

PARKINSON, D. Oxygen free radicals: in search of a unifying theory of disease. **Intensive Crit Care Nurs**, v. 11, n. 6, p. 336-40, Dec 1995. ISSN 0964-3397. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8574085> >.

QING, Z. et al. Relationship of advanced oxidative protein products in human saliva and plasma: age- and gender-related changes and stability during storage. **Free Radic Res**, v. 46, n. 10, p. 1201-6, Oct 2012. ISSN 1029-2470. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22671992> >.

REMER, T.; MONTENEGRO-BETHANCOURT, G.; SHI, L. Long-term urine biobanking: storage stability of clinical chemical parameters under moderate freezing conditions without use of preservatives. **Clin Biochem**, v. 47, n. 18, p. 307-11, Dec 2014. ISSN 1873-2933. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25239781> >.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 11, p. 1603-16, Dec 2010. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20840865> >.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. **CRC Press**, 1991.

SAYEDDA, K.; AHMED, K. S. Salivary total antioxidant activity as a non invasive biomarker for oxidative stress in asthmatic patients. *National Journal of Integrated Research in Medicine* V. 3, p. 8-12, 2012.

SEGAL, A.; WONG, D. T. Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. **Eur J Dent Educ**, v. 12 Suppl 1, p. 22-9, Feb 2008. ISSN 1396-5883. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18289265> >.

SHAN, X. Q.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**, v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2195557> >.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med**, v. 91, n. 3C, p. 31S-38S, Sep 1991. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1928209> >.

SILVESTRE, D. et al. Frozen breast milk at -20 degrees C and -80 degrees C: a longitudinal study of glutathione peroxidase activity and malondialdehyde concentration. **J Hum Lact**, v. 26, n. 1, p. 35-41, Feb 2010. ISSN 1552-5732. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759352> >.

SPIELMANN, N.; WONG, D. T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. **Oral Dis**, v. 17, n. 4, p. 345-54, May 2011. ISSN 1601-0825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122035> >.

TARPEY, M. M.; WINK, D. A.; GRISHAM, M. B. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 286, n. 3, p. R431-44, Mar 2004. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14761864> >.

THOMADAKI, K. et al. Whole-saliva proteolysis and its impact on salivary diagnostics. **J Dent Res**, v. 90, n. 11, p. 1325-30, Nov 2011. ISSN 1544-0591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917601> >.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação**. Quím. Nova. 30 2007.

VLKOVÁ, B. et al. Salivary markers of oxidative stress in patients with oral premalignant lesions. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 12, p. 1651-6, Dec 2012. ISSN 1879-1506. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092610> >.

WAYNER, D. D. et al. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. **FEBS Lett**, v. 187, n. 1, p. 33-7, Jul 1985. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4018255> >.

WILLEMSE, E. A. et al. Standard biobanking conditions prevent evaporation of body fluid samples. **Clin Chim Acta**, v. 442, p. 141-5, Mar 2015. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25661086> >.

## 7 APÊNDICES

### FIGURAS

FIGURA 1. PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).

FONTE: O AUTOR

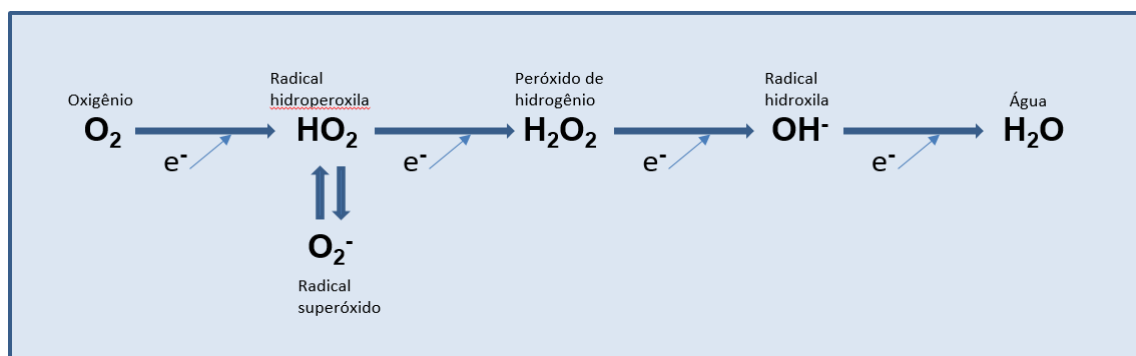
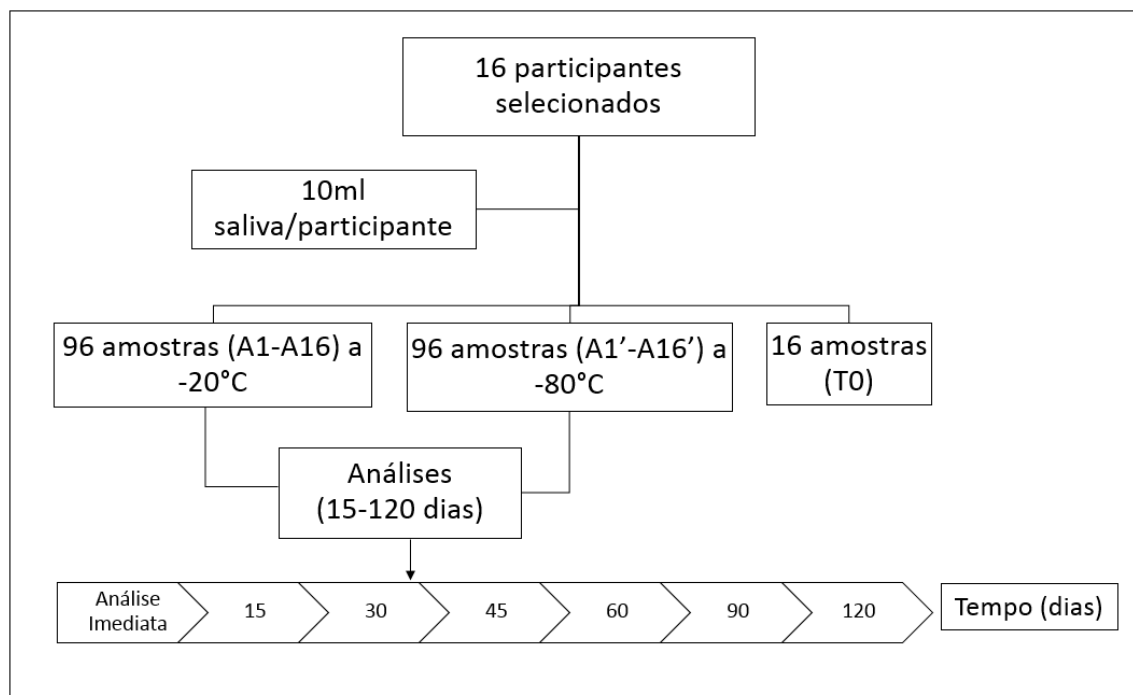


FIGURA 2. TOTAL DE AMOSTRAS ANALISADAS.

FONTE: O AUTOR



## TABELAS

TABELA 1. A MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO E DESVIO PADRÃO DOS OXIDANTES, ANTIOXIDANTES E O ÍNDICE DO ESTRESSE OXIDATIVO A TEMPERATURA DE -20°C.

	<b>T0</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T15</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T30</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T45</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T60</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T90</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T120</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>
<b>Estado</b>							
<b>oxidante</b>	3,28	3,55	2,79	2,88	2,88	1,84	1,78
<b>total (µM)</b>	(1,78) <sup>a,b</sup>	(1,04)	(1,51)	(1,76)	(1,11)	(0,78) <sup>a</sup>	(0,70) <sup>b</sup>
<b>Capacidade</b>							
<b>antioxidante</b>	3,53	3,71	2,80	2,78	2,44	2,39	2,09
<b>total (mM)</b>	(0,72) <sup>c,d</sup>	(1,21)	(1,66)	(1,81)	(2,09)	(1,29) <sup>c</sup>	(1,51) <sup>d</sup>
<b>Índice de</b>							
<b>estresse</b>	0,093	0,096	0,100	0,104	0,118	0,0767	0,0852
<b>oxidativo</b>							

\*Letras iguais indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

TABELA 2. A MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO E DESVIO PADRÃO DOS OXIDANTES, ANTIOXIDANTES E O ÍNDICE DO ESTRESSE OXIDATIVO A TEMPERATURA DE -80°C.

	<b>T0</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T15</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T30</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T45</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T60</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T90</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>	<b>T120</b> <b>Média</b> <b>(dp)</b>
<b>Estado</b>							
<b>oxidante</b>	3,28	3,40	3,31	3,34	3,53	1,99	1,94
<b>total (µM)</b>	(1,78) <sup>a,b</sup>	(1,55)	(1,25)	(1,58) <sup>e</sup>	(0,76) <sup>c,d</sup>	(1,27) <sup>a,c,e</sup>	(0,76) <sup>b,d</sup>
<b>Capacidade</b>							
<b>antioxidante</b>	3,53	3,24	2,48	2,68	2,55	2,59	1,79
<b>total (mM)</b>	(0,72) <sup>f,g</sup>	(1,16) <sup>h</sup>	(1,56) <sup>i</sup>	(2,21)	(1,79)	(1,48) <sup>f,h,i,j</sup>	(1,00) <sup>g,j</sup>
<b>Índice de</b>							
<b>estresse</b>	0,093	0,105	0,133	0,125	0,138	0,0768	0,108
<b>oxidativo</b>							

\*Letras iguais indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).



## GRÁFICOS

GRÁFICO 1 (a). EXEMPLO DE CURVA PADRÃO PARA O EOT.

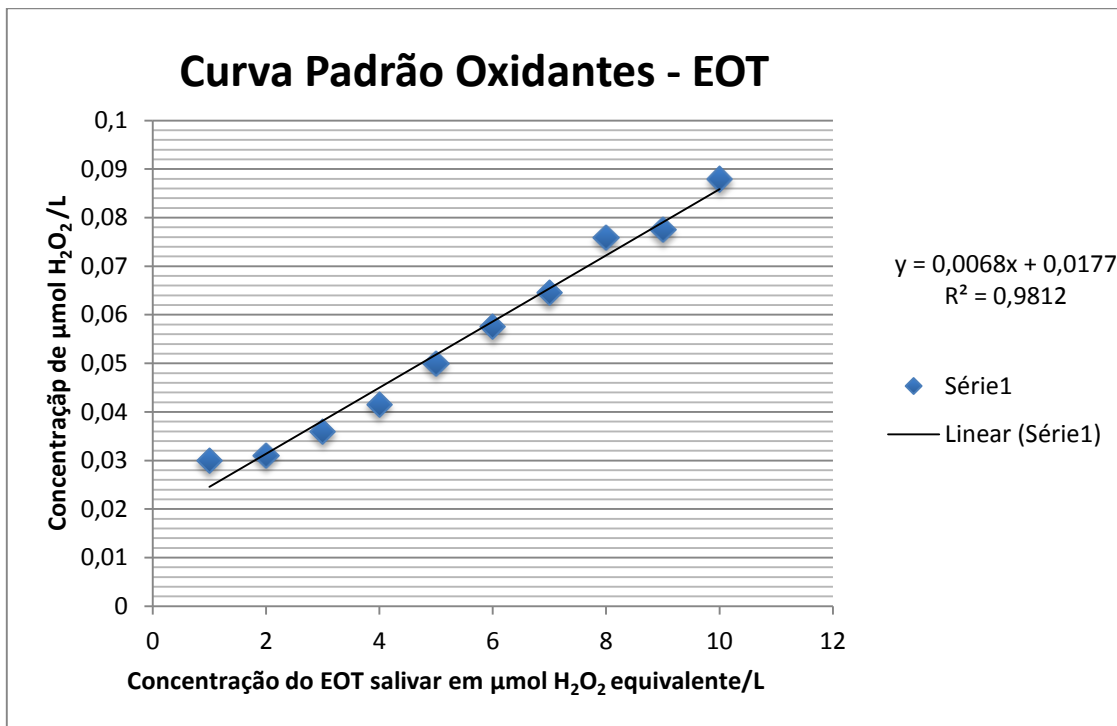


GRÁFICO 1(b). EXEMPLO DE CURVA PADRÃO PARA A CAT.

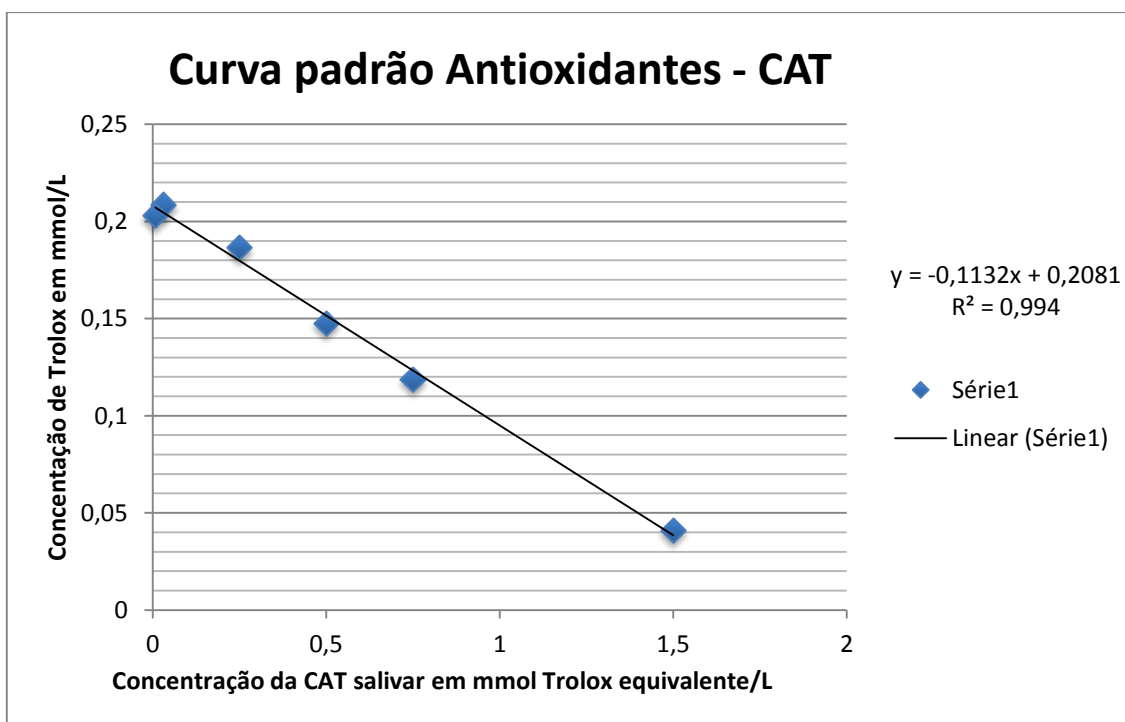


GRÁFICO 2. (a) MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO DOS OXIDANTES NAS DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE 120 DIAS.

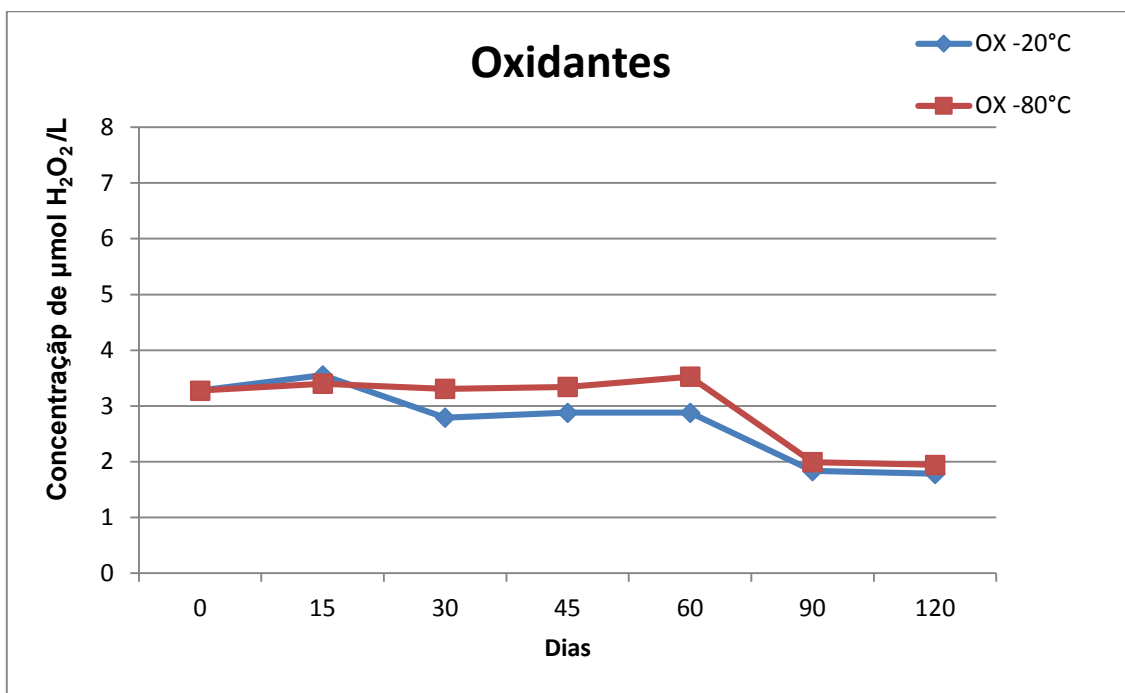


GRÁFICO 2 (b). MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES NAS DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE 120 DIAS.

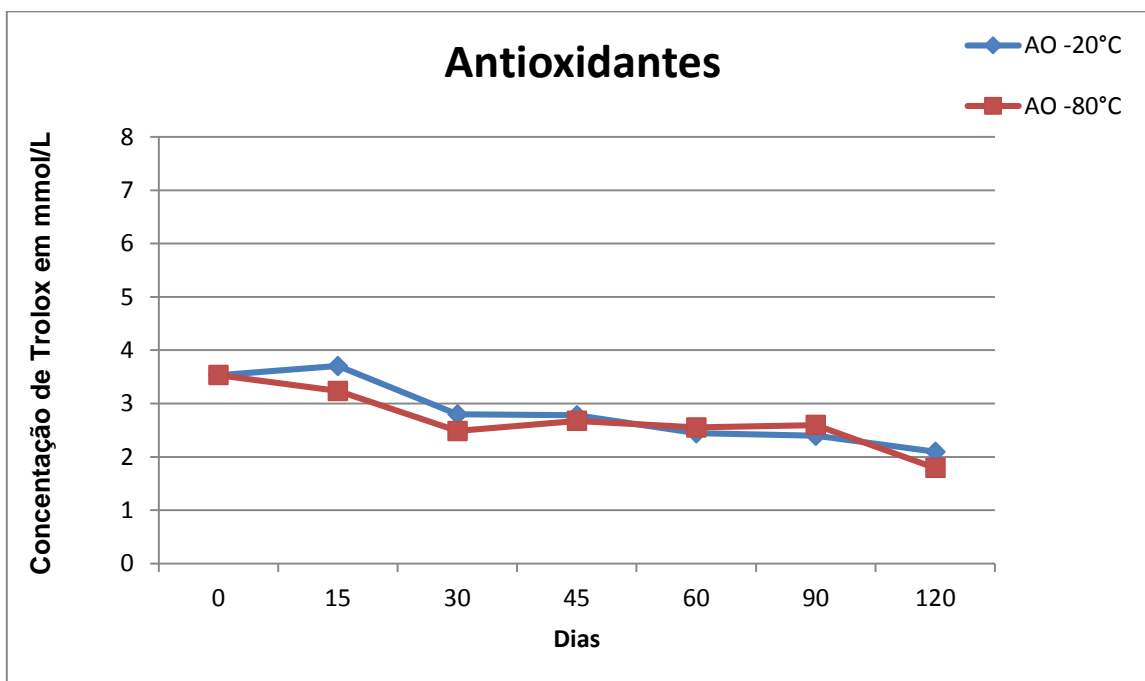
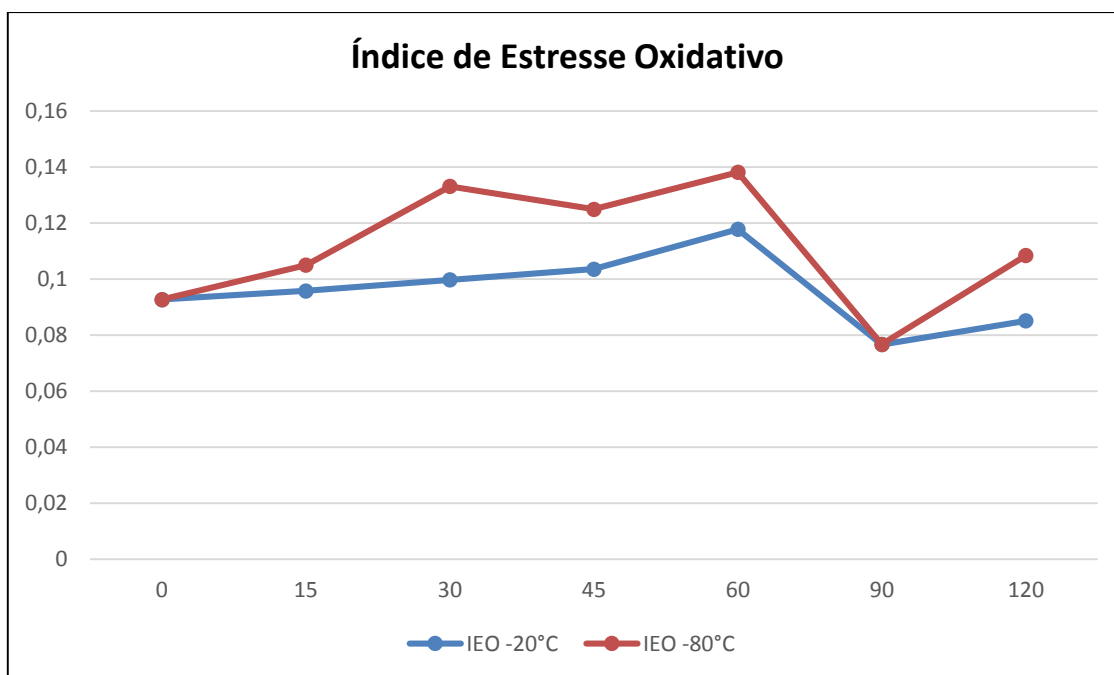


GRÁFICO 3. ÍNDICE DE ESTRESSE OXIDATIVO AO LONGO DOS 120 DIAS.



## 8 ANEXOS

ANEXO 1-	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	75
ANEXO 2-	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.....	77
ANEXO 3-	NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS (ARTIGO: DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO IDEAIS DA SALIVA PARA A AVALIAÇÃO DO ESTADO OXIDATIVO).....	81

## ANEXO 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, José Miguel Amenábar, Josi Karla Amadeu, Aline Lemes e Juliana Schussel, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o(a) Senhor(a) a participar de um estudo intitulado "Avaliar a capacidade antioxidante total, estado oxidante total e índice de estresse oxidativo presentes na saliva em diferentes tempos de coleta e diferentes temperaturas de armazenamento". Este estudo visa criar um método de coleta e armazenamento de saliva para estudos futuros.

- a) O objetivo desta pesquisa é avaliar a componentes químicos presentes na saliva em diferentes tempos de coleta e diferentes temperaturas de armazenamento.
- b) Caso você participe da pesquisa, será necessário coletar sua saliva durante um período de 10 minutos uma única vez. A coleta deverá ser realizada com intervalo de uma hora após a refeição e/ou com mesmo intervalo da última higiene bucal. Para a coleta, deverá permanecer sentado verticalmente em local confortável e antes do início da coleta será solicitado que degluta a saliva presente na cavidade bucal. Então, após cada 30 segundos, despejará a saliva secretada dentro de um recipiente devidamente identificado. O tempo de coleta será controlado pelo examinador com o auxílio de um cronômetro digital. A saliva coletada será armazenada em freezer para posterior análise. Após finalizado o estudo, o material será guardado por 90 dias e então descartado.
- c) Para tanto você deverá comparecer na clínica da disciplina de Estomatologia do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná (Av. Lothário Meissner, 632) para realização da coleta que não deverá tomar mais do que 20 minutos do seu tempo.
- d) Não existe nenhum risco previsto ao estudo.
- e) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: obter a melhor maneira de utilizar a saliva em estudos científicos. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- f) O pesquisador José Miguel Amenábar, professor adjunto da disciplina de Estomatologia da UFPR, pode ser contatado pelo telefone: 3360-4024 ou ainda na clínica de Odontologia da UFPR, localizada na Av. Lothário Meissner, 632, para esclarecer eventuais dúvidas que o(a) Sr.(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo. O Sr.(a) poderá ainda solicitar outras informações as demais colaboradoras do estudo:
- g) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

Rubricas:  
 Participante da Pesquisa e /ou responsável legal \_  
 \_\_\_\_\_  
 Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_  
 Orientador \_\_\_\_\_ Orientado \_\_\_\_\_

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR  
 Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240  
 Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

- h) As informações relacionadas ao estudo poderão conhecidas por pessoas autorizadas, como os alunos de pós-graduação relacionados ao projeto. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.**
- i) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa e fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do Participante de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Rubricas:  
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal\_-  
\_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável\_\_\_\_\_  
Orientador \_\_\_\_\_ Orientado \_\_\_\_\_

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da FUFPR  
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP: 80060-240  
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação da capacidade antioxidante total, estado oxidante total e índice de estresse oxidativo presentes na saliva em diferentes tempos de coleta e diferentes temperaturas de armazenamento.

**Pesquisador:** José Miguel Amenábar Céspedes

**Versão:** 3

**CAAE:** 34644414.6.0000.0102

**Instituição Proponente:** Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 872.583

**Data da Relatoria:** 03/11/2014

**Apresentação do Projeto:**

Projeto proveniente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, sob responsabilidade do Prof. José Miguel Amenábar Céspedes, com participação das mestrandas Josi Karla Amadeu e Aline Louise Lemes e colaboração de Juliana Lucena Schussel. As atividades serão realizadas no Laboratório de Biologia Bucal até setembro de 2015.

**Objetivo da Pesquisa:**

- Avaliar a capacidade antioxidante total, estado oxidante total e índice de estresse oxidativo presentes na saliva em diferentes tempos de coleta e diferentes temperaturas de armazenamento.
- Estabelecer e validar a melhor metodologia de uso da saliva para estudos de diagnóstico.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Este estudo pode gerar desconforto e ressecamento da boca devido ao longo período de coleta proposto. Como benefícios deverá resultar na criação de um protocolo otimizado de coleta e armazenamento de saliva para estudos de diagnóstico.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os participantes deverão comparecer em um único dia pré estabelecido para coleta de saliva e serão abordados na clínica de Odontologia da UFPR, onde receberão as informações necessárias e assinarão o TCLE caso concordem em participar do estudo.

Participarão do estudo 20 pessoas de ambos os sexos com idades entre 20 e 40 anos que serão recrutados por meio de cartazes na clínica de Odontologia da UFPR. As amostras de saliva serão coletadas em recipientes descartáveis, estéreis, por um período de dez minutos. A coleta deve ser realizada com intervalo de uma hora após a refeição e com mesmo intervalo da última higiene bucal. O participante será orientado a permanecer sentado verticalmente em local confortável e antes do início da coleta será solicitado que degluta a saliva presente na cavidade bucal. Então, após cada 30 segundos, despejará a saliva secretada dentro de um recipiente devidamente identificado. Uma alíquota da saliva de cada tempo será utilizada para imediata avaliação e o restante será



estocado a -20 °C e -80 °C em freezer durante 30, 60 e 90 dias, quando serão repetidas as análises. As amostras serão descartadas após 90 dias.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram devidamente anexados.

**Recomendações:**

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pendências atendidas. Sou de parecer favorável à aprovação do projeto.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

CURITIBA, 14 de Novembro de 2014

---

**Assinado por:  
IDA CRISTINA GUBERT  
(Coordenador)**

### ANEXO 3- Normas para publicação – Journal of Clinical Laboratory Analysis

([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1098-2825/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2825/homepage/ForAuthors.html))

#### Author Guidelines

#### Wiley's Journal Styles

**Conflict of Interest Disclosure:** Journal of Clinical Laboratory Analysis now requires that **all authors** fill out the ICMJE Form for Potential Conflicts of Interest upon initial submission of their manuscript and upload the completed forms as “Supplementary Material for Review”. In addition, any information disclosed on the form should be summarized as a statement on the manuscript title page. Authors may download the disclosure form by visiting [http://www.icmje.org/coi\\_disclosure.pdf](http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf).

#### Submission of Manuscripts

Submit your manuscript electronically at <http://mc.manuscriptcentral.com/jcla>  
Editorial correspondence should be addressed to:

Dr. Richard A. McPherson, Editor  
Maryann Fischler, Managing Editor  
Journal of Clinical Laboratory Analysis  
Editorial Office  
Department of Pathology  
Medical College of Virginia Hospitals  
Virginia Commonwealth University  
Richmond, VA 23298-0258  
(804) 828-5389; Fax (804) 828-6156

**Title Page.** Make titles brief and specific. Indicate author(s), affiliation(s), and source of support. Give the address, Fax and telephone numbers, and the E-mail address of the author responsible for proofs. Please indicate name, address, Fax and telephone numbers of author to whom reprint requests are to be sent. Provide a short version of the title (no more than 40 characters) for running heads. List five to ten key words that will adequately index the subject matter, preferably from the *Index Medicus* list of accepted key words; do not repeat words from the title.

**Structured Abstract.** This should be typed, double-spaced on a separate page and is not to exceed 200 words. The substance of it should be factual and comprehensive on its own. It should be sectioned into Background, Methods, Results and Conclusion.

**Organization of Text.** Each page after the first, including references, legends, and tables, should be numbered consecutively with last name of the senior author at the page top. Quotations must be accurate and give full credit to source. Permission to quote and reproduce text previously published must be cleared by the author and copies of all permissions must be included with the manuscript. Indicate placement of all tables and illustrations in the text. Text should be divided into the following sections: introduction, materials and methods, results, discussion.

### **References.**

References should be cited in the text numerically and set off by parentheses, i.e., (1), (2). References should be listed as they appear, numbered consecutively, and typed double-spaced. Follow the style of *Index Medicus* and do not use periods after abbreviations of journal titles. Authors are responsible for bibliographic accuracy and must check every reference in the manuscript and proof-read upon receipt of proofs.

### **Journal:**

1. Freedman JB, Musclow EG, Garvey BL, Abbott D. Unexplained periparturient thrombocytopenia. *Am J Hematol* 1994;21:397-407.

### **Chapter in a Book:**

2. Glassy MC, Gaffar SA, Peters RE, Royson I. 1994. Human monoclonal antibodies to human cancer cells. In: RA Reisfeld, S Sell, editors. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. New York: Wiley-Liss, Inc. p 97-109.

### **Book:**

3. Reisfeld RA, Sell SM, editors. 1994. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. New York: Wiley-Liss, Inc.

**Tables.** Tables should be typed double-spaced, each on a separate page at the end of the manuscript. The tables should be numbered consecutively with arabic numerals and contain a brief, specific title. The data presented in the table must be logically and clearly organized; it should be self-explanatory and should supplement, not duplicate the text.

**Illustrations.** Drawings and figures should be of high quality and camera ready. Halftones (photographs, photomicrographs, electron micrographs, roentgenograms) should be submitted cropped and unmounted. Halftones that

are grouped under one figure number should be lettered "a," "b," "c," etc. on the lower right-hand corner. Color will be printed only at the author's expense. Upon acceptance of color illustrations, the publisher will provide price quotes.

**Legends.** They should be numbered consecutively with arabic numbers and typed double-spaced on a separate sheet of 8.5 × 11-inch white bond paper. They should be brief and specific. Magnification for light photomicrographs should be indicated, if possible. Internal scale markers are suggested for electron micrographs. The type of stain used should be indicated in the legend only if it is other than hematoxylin and eosin.

Only previously unpublished work should be submitted; all text, including solicited material, is subject to editorial review and revision. Only manuscripts in English will be accepted and manuscripts become the property of the Journal and may not be published elsewhere without written permission from both the editor and publisher. Upon acceptance of a manuscript for publication, the author will be requested to sign an agreement transferring copyright to the publisher.